

THÈSE

présentée à

L'U.E.R. PHYSIQUE-CHIMIE-BIOLOGIE
DE L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY

(Mention sciences)

par

Martial VILLEMIN

Docteur Vétérinaire

Membre correspondant de l'Académie Vétérinaire de France

Ancien chef du laboratoire de diagnostic
au Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy

Vétérinaire Inspecteur au Ministère de l'Agriculture

Problèmes posés par le diagnostic expérimental de la Rage

A PROPOS DES 2.000 PREMIERS PRELEVEMENTS
EXAMINES AU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE

Soutenue publiquement le 28 mars 1973
devant la commission d'examen.

Membres du Jury :

Président :	M. A. VEILLET
Examineurs :	M. B. CONDÉ
	M. R. FRENTZ
	M. L. ANDRAL

A MA FEMME

A FRANÇOIS

ANNE

JEAN

CHRISTINE

et PIERRE

A MONSIEUR PIERRE MESSMER

A Monsieur le Professeur André VEILLET
Professeur de Biologie animale
qui a accepté de présider notre jury de thèse
et qui veut bien nous conseiller dans nos travaux actuels

A Monsieur le Professeur Bruno CONDÉ
et

A Monsieur le Professeur René FRENTZ
qui ont bien voulu faire partie du jury
Hommage reconnaissant

Au Docteur Louis ANDRAL
Vétérinaire-Inspecteur en Chef
Directeur du Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy
qui non seulement a bien voulu m'autoriser à entreprendre
ce travail mais m'a apporté le secours de son expérience

A Monsieur le Professeur P. ATANASIU
et

A Monsieur le Professeur A. GAMET
de l'Institut Pasteur de Paris
en hommage sincère pour leur bienveillance
et leurs excellents conseils

J'adresse mes vifs remerciements
au Centre de Recherche et d'Elevage des Oncins
et au Laboratoire Roger Bellon
qui ont bien voulu m'aider pour la publication de cette thèse

DU MEME AUTEUR

Influence de différentes substances oestrogènes sur la calcémie des oiseaux et des mammifères. Lyon, Impr. G. Neveu et Cie, 1949, 49 pages - Thèse de Doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, 1948-1949, n° 30. Soutenue publiquement le 7 juin 1949.

Le vison, biologie, élevage, pathologie. 1^{re} édition, 338 pages, 22 figures et 5 planches hors-texte, 1956. 2^e édition, 356 pages, 31 figures et 5 planches hors-texte, 1962, Vigot Frères éditeurs, Paris. Ouvrage couronné par l'Académie Vétérinaire de France (Médaille d'argent, 1960).

Génétique du vison (en collaboration avec Madame Andrée TETRY), 210 pages, 25 figures et 9 hors-texte en couleurs, Vigot Frères éditeurs, Paris, 1959. Ouvrage couronné par l'Académie d'Agriculture de France (Médaille d'Argent, 1959) et par l'Académie Vétérinaire de France (Médaille d'argent, 1960).

Dictionnaire des termes vétérinaires et zootechniques, 360 pages, Vigot Frères éditeurs, Paris, 1963.

Les affections des doigts chez les bovins. 103 pages, 17 figures et 5 planches hors-texte. Vigot Frères éditeurs, Paris, 1970.

IX. *Les animaux à fourrure ; 8. Pathologie des animaux à fourrure*, in *Les maladies animales, leur incidence sur l'économie agricole* (Ouvrage collectif par 41 spécialistes sous la direction de M. Paul MORNET). S.P.E.I. éditeur, Paris, 1972.



Longtemps, l'enseignement a eu pour mission de préparer à des fonctions types, à des situations stables ; pour un moment de l'existence ; pour un métier déterminé ou un emploi donné ; d'inculquer un savoir conventionnel, ancestralement délimité. Cette conception prévaut trop souvent encore. Pourtant, la notion de l'acquisition dans le jeune âge d'un bagage intellectuel ou technique suffisant pour toute la durée de l'existence, est périmée. C'est un axiome fondamental de l'éducation traditionnelle qui s'écroule. Le moment n'est-il pas venu d'exiger bien autre chose des systèmes éducatifs ? Apprendre à vivre ; apprendre à apprendre, de façon à pouvoir acquérir des connaissances nouvelles tout au long de la vie ; apprendre à penser de façon libre et critique ; apprendre à aimer le monde et à le rendre plus humain ; apprendre à s'épanouir dans et par le travail créateur.

Edgar FAURE : Apprendre à être
(Collection Le Monde sans Frontières,
Unesco-Fayard, Paris, 1972)

01 — AVANT-PROPOS

La rage a été récemment réintroduite dans notre pays. Le premier cas a été reconnu en 1968. Depuis ce moment, l'Institut Pasteur de Paris retrouvant là en quelque sorte sa vocation première, celle même qui fut sa raison de naître en 1888, a pratiqué l'examen de très nombreux animaux. Poussé par la nécessité de soulager l'Institut Pasteur de l'examen de nombreux cas qui ressortissent exclusivement à l'épizootologie, le Ministère de l'Agriculture avait créé un laboratoire de diagnostic de la rage au service de Virologie II du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires à Alfort *. La Chaire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Strasbourg a traité pour sa part les prélèvements venant du Bas-Rhin et du Haut-Rhin. Depuis le début officiel de ses travaux, le 1^{er} septembre 1971, le Laboratoire de diagnostic du Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy a été saisi jusqu'au jour de référence **, de 2.000 demandes de diagnostic. C'est dire si la création de cet organisme répondait à une nécessité réelle.

* Le diagnostic de la rage n'a plus été réalisé au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires depuis le 24 février 1972.

** 10 octobre 1972, jour où nous avons à notre disposition les résultats complets des 2.000 premiers examens.

A dater du 24 février 1972, un arrêté ministériel nous a donné mission pour le diagnostic de la rage sur l'ensemble du territoire national.

Reste à préciser que les animaux suspects d'avoir contaminé une personne doivent toujours être adressés soit à l'Institut Pasteur de Paris, soit au Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Strasbourg. Nous ne faisons que des diagnostics « vétérinaires », c'est-à-dire des diagnostics qui ne comportent en aucun cas une sanction thérapeutique humaine éventuelle.

Par ailleurs, il faut souligner que ce Centre a une particularité unique par rapport à tous les autres organismes que nous venons de citer, il est dédié exclusivement à l'étude de la rage ; en conséquence, le diagnostic, dans sa totalité, est obtenu par l'équipe que nous avons formée et qui se trouve sous nos ordres. La réception des prélèvements, leur mise en exploitation, les manœuvres diagnostiques (immunofluorescence et coloration de Sellers sur calques ; histopathologie sur coupes ; inoculation aux souris) sont faites entièrement ici, sans intervention d'un autre service.

Il est évident que cette façon de faire n'est pas sans inconvénients possibles. Il faut une particulière honnêteté intellectuelle pour ne pas s'approuver sans discussion, pour admettre que deux examens successifs pratiqués par la même personne ou par deux membres de l'équipe, soient divergents. Il faut qu'immédiatement un réflexe salutaire se déclenche ; qu'une vérification objective soit entreprise non pas d'une, mais des deux méthodes.

Cette façon de faire est extrêmement enrichissante ; elle nous a permis d'arriver à une précision très grande dans le travail de l'ensemble du personnel.

De la sorte nous avons le sentiment, d'abord d'avoir progressé rapidement et ensuite d'avoir tout mis en œuvre pour respecter la fiabilité des divers examens, avec leurs insuffisances par défaut ou par excès qui sont, ainsi que nous le verrons, le lot de toute méthode biologique quelle qu'elle soit.

En tous cas, nous avons pensé que l'expérience des 2.000 cas que notre équipe a acquise dans ce domaine méritait de faire l'objet d'un travail récapitulatif.

Nous adressons nos remerciements à Monsieur le Docteur Louis ANDRAL, Vétérinaire-Inspecteur en Chef, Directeur du Centre d'Etudes sur la Rage, qui ne nous a jamais refusé ses conseils éclairés en sorte que les pages qui suivent lui doivent beaucoup.

Nous devons également remercier nos collaboratrices au laboratoire de diagnostic : Mesdames PATRON et SELVE, Mesdemoiselles Josiane VAUTRAVERS et Marie-José VAUTRAVERS, sans oublier la Secrétaire Madame RITLENG. L'esprit d'équipe dont les unes et les autres font preuve a été la condition même de l'efficacité de notre travail.

02 — PLAN DU TRAVAIL

1. GENERALITES

2. LES CONDITIONS DE TRAVAIL AU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE

3. LES TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC

- 3.1. Généralités sur ces techniques
- 3.2. Techniques préparatoires communes
- 3.3. L'immunofluorescence
- 3.4. La coloration de Sellers
- 3.5. L'histopathologie
- 3.6. L'inoculation aux souris

4. RESULTATS OBTENUS AU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE

- 4.1. Résultats globaux, toutes espèces réunies
- 4.2. Résultats globaux par espèces animales
- 4.3. Résultats globaux : comparaison entre les différentes techniques aboutissant au diagnostic
- 4.4. Résultats détaillés : les examens détaillés par moins de quatre techniques
- 4.5. Résultats détaillés : les examens réalisés par les quatre techniques
- 4.6. Résultats détaillés par espèces animales
- 4.7. Durée moyenne de l'incubation chez les souris inoculées
- 4.8. Délai d'envoi de la réponse aux 2.000 premières demandes de diagnostic

5. COMPARAISONS AVEC LES RESULTATS OBTENUS DANS D'AUTRES CENTRES DE DIAGNOSTIC DE LA RAGE

6. CONCLUSIONS

7. BIBLIOGRAPHIE

1. GENERALITES

1.1. La rage dans le monde

Il est plus facile de dresser la liste des pays totalement indemnes de rage dans le monde que de donner celle des pays atteints en tout ou en partie *. Les pays indemnes sont les suivants :

Australie	Irlande	Norvège
Comores	Islande	Papouasie
Chypre	Japon	Portugal
Espagne	Malaisie	Réunion (île de la)
Fidji (île)	Maurice (île)	Royaume-Uni de
Finlande	Nouvelle Calédonie	Grande-Bretagne
Formose	Nouvelle Guinée	Samoa-Ouest
Hawaï	Nouvelles Hébrides	Suède
Hollande	Nouvelle Zélande	

Nous suivons dans cet exposé le travail de CHALMERS et SCOTT (1969) qui envisagent la rage dans le monde selon le « climax » dont elle fait partie, climax étant pris par eux avec le sens de « conditions écologiques stables ». C'est ainsi que la rage revêt différentes formes selon le continent ou la grande région où on l'envisage.

Il convient toutefois de bien préciser que les dénominations zoologiques des divers « climax » n'impliquent nullement que la rage y sévisse uniquement sur l'espèce indiquée ; cela signifie que l'ordre, la famille ou l'espèce animale mentionné se trouve être, dans les conditions du milieu, le vecteur et le réservoir habituels et principaux du virus rabique ; de là ensuite il peut passer aux autres espèces animales réceptives. On sait par ailleurs que le virus de la rage est pathogène, dans les conditions naturelles, pour tous les mammifères et les oiseaux.

Il est d'ailleurs facile de se convaincre que les « climax » n'ont rien de spécifique en remarquant la superposition de certains d'entre eux dans diverses régions du globe.

1.1.1. La rage des Chiroptères

Elle se confine dans l'aire de distribution géographique des Desmodontidés, à savoir l'Amérique Centrale et le nord de l'Amérique du Sud. Il s'agit du vampire véritable (*Desmodus rotundus*), du vampire sans queue (*Diphylla ecaudata*) et du vampire à ailes blanches (*Diaemus youngi*). Ces animaux sont peu sensibles au virus rabique, si bien que, dans la plupart des cas, ils ne meurent pas après contamination, mais guérissent et deviennent des infectés inapparents, véritables porteurs sains, qui peuvent transmettre à leur tour la maladie pendant plusieurs mois sous l'effet de leurs morsures.

* L'Antarctique est le seul continent qui soit absolument indemne de rage.

Il ne semble pas que les chauves-souris d'Europe, insectivores on le sait, puissent jouer le même rôle ; des expériences ont cependant montré qu'une fois inoculé, le virus envahit la graisse brune où il persiste sans amener de troubles morbides. Toutefois le mode d'alimentation de ces animaux réduit considérablement le risque ; au surplus on n'a découvert que très exceptionnellement une chauve-souris naturellement infectée en Europe Centrale (PITZSCHKE, 1966).

1.1.2. La rage des Mustelidés

Cette forme écologique de l'enzootie rabique se situe dans le nord de la zone tempérée et dans la région arctique ; on incrimine l'hermine (*Mustela erminea*), le putois tacheté (*Vormela peregusna*), ainsi que le blaireau (*Meles meles*), la martre (*Martes foina*) et la belette (*Mustela nivalis*).

1.1.3. La rage du skunks* (*Mephitis mephitis*)

Elle est apparue et se maintient en progressant dans deux régions distinctes des Etats-Unis : les grandes plaines centrales et la vallée centrale de Californie.

1.1.4. La rage du chien et du chat des villes

Longtemps la rage des carnivores domestiques des cités a été la forme la plus connue de la rage, notamment en Europe Occidentale. On sait qu'elle a laissé la place actuellement à une rage sylvatique (de la forêt) ou encore dite selvatique (de la campagne — du portugais : selva).

1.1.5. La rage du loup (*Canis lupus*)

Comme celle du chien, elle a longtemps sévi en Europe. On ne la rencontre plus qu'en Asie et spécialement en Iran où elle pose encore un problème dans certaines régions.

1.1.6. La rage du coyote (*Canis latrans*)

On la connaît en Amérique du Nord, voire en Amérique Centrale.

1.1.7. La rage du raton laveur (*Procyon lotor*)

C'est également dans de vastes régions de l'Amérique du Nord qu'elle est présente. Son aire d'extension augmente actuellement.

1.1.8. La rage du lynx (*Lynx rufus*)

Elle a été très accidentellement signalée aux Etats-Unis.

1.1.9. La rage de l'opossum (*Didelphis marsupialis*)

Cet animal possède une bonne résistance naturelle au virus rabique ; on a toutefois rencontré quelques cas de rage naturelle dans cette espèce.

1.1.10. La rage des Viverridés

Sont en cause la mangouste (*Cynictis penicillata*), la genette (*Genetta felina*), la civette (*Civettictis civetta*) et le putois d'Amérique (*Zorilla striatus*). Elle se rencontre en Inde, en Afrique du Sud et dans les îles Caraïbes.

* Que l'on nomme indifféremment en français : *skunks*, *sconce*, ou *sconse*, ou bien encore *moufette*.

1.1.11. La rage des Canidés sauvages, dont le chacal (*Canis aureus*)

Elle est surtout connue en Afrique, en Inde, en Arabie et dans le sud-est de l'Asie. Dans l'Ouest africain francophone, c'est l' « oulou fato » ou maladie du chien fou. En Ethiopie, ANDRAL et SERIÉ (1957), puis SERIÉ et ANDRAL (1960) purent mettre en évidence chez un chien une excrétion périodique du virus rabique par la salive tout au long d'une période de 20 mois ; en second lieu ils ont montré que sur 100 chiens errants possédant tous les caractères de la bonne santé, 14 possédaient des anticorps neutralisants indiquant qu'ils avaient été en contact avec le virus rabique sans pour autant succomber.

1.1.12. La rage des rongeurs

C'est sur la rage des Muridés que l'équipe de travail européenne de l'Organisation Mondiale de la Santé a axé son effort. Il résulte qu'en l'état actuel des travaux (Réunion des experts européens de la rage des animaux sauvages, organisée par l'O.M.S. au Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy, du 3 au 5 juillet 1972), quarante souches virales constituant des variantes du virus rabique ont été isolées en Tchécoslovaquie, en Allemagne et en Suisse chez des rongeurs de la famille des Microtinés et de celle des Muridés. Ces souches sont « similaires » au virus rabique, mais elles ne sont pas identiques aux souches classiquement connues. Il semble que ces virus puissent rester latents chez certains rongeurs ; on peut les isoler des glandes salivaires ou de la graisse brune sans pour autant les retrouver dans le système nerveux central. De toute manière leur concentration est faible, il faut des passages en série pour aboutir à une infection apparente. Il semble donc probable que la transmission par les moyens classiques (c'est-à-dire surtout morsure et accessoirement aérosols) doive être exclue. Les souches isolées sur les rongeurs diffèrent donc de celles isolées sur le renard ; il n'apparaît donc pas que la rage des rongeurs puisse constituer le réservoir de la rage vulpine. Cette donnée, pour négative qu'elle soit, est importante à connaître car elle aidera à faire disparaître de certains esprits l'idée, toute gratuite d'ailleurs, selon laquelle les rongeurs étant les véritables réservoirs (porteurs plus ou moins sains) du virus rabique, il est à peu près vain d'espérer lutter contre la zoonose en faisant diminuer les populations vulpines. La lutte contre la prolifération du renard sera facilitée d'autant, quand cette idée aura disparu des esprits.

1.1.13. La rage du renard (*Vulpes vulpes*)

Cette forme de rage est des plus anciennement connues en Europe. On considère cependant que l'enzootie que nous subissons actuellement a pris naissance vers 1930 ou 1935 en Pologne, de là elle a gagné l'Allemagne de l'Est, puis de l'Ouest, la Tchécoslovaquie ; en 1964 le Danemark pour la première fois, la Belgique et le Luxembourg

et l'Autriche en 1966, la Suisse en 1967, pour atteindre la France en 1968. Notons qu'envahi à quatre reprises entre 1964 et 1972, le Danemark est parvenu chaque fois à se libérer et qu'également la Belgique* et le Luxembourg semblent être arrivés à en faire autant en 1971-1972.

La rage vulpine qui est prépondérante en Europe se retrouve également à titre accessoire dans d'autres régions du globe, notamment dans l'Arctique avec le renard arctique (*Alopex lagopus*), aux Etats-Unis avec le renard gris (*Urocyon cinereoargenteus*).

Il ne semble pas que le renard soit capable de transmettre la maladie en tant que porteur sain, alors que le chien, on l'a vu, est susceptible de le faire.

L'enzootie européenne actuelle semble offrir un rythme d'exacerbation locale chaque 3 ou 4 ans, à la suite des modifications de la population vulpine. On estime que 50 pour 100 environ des renards sont détruits à la suite du passage de la maladie ; il faut quelques années pour que la population se reconstitue à son niveau initial. A l'intérieur de ce cycle de 3 ou de 4 ans, on remarque des cycles annuels avec recrudescence des cas au début du printemps (sous l'influence du rut, amenant la recherche des femelles et les batailles entre mâles) et au début de l'hiver (moment où les renardeaux de l'année commencent à vivre d'une vie autonome).

La densité du renard en dessous de laquelle la maladie semble ne plus pouvoir se transmettre est de 0,2 à 0,3 renard par kilomètre carré. En dessous de ce seuil, la rage disparaît chez toutes les espèces. La diminution des populations vulpines est le seul moyen qui permette, pourvu qu'il soit mis en œuvre vigoureusement, de se débarrasser de la rage.

1.2. La rage en France

Notre propos n'est pas d'entrer dans les détails de l'épizootie de rage qui déferle sur notre pays. Cependant, pour bien situer le problème, nous devons donner quelques indications et quelques chiffres qui permettront de se représenter l'incidence de la rage animale dans notre pays.

* En Belgique, le nombre des cas de rage (toutes espèces réunies) a été le suivant :

40 cas en 1966	161 cas en 1969
324 cas en 1967	20 cas en 1970
453 cas en 1968	6 cas en 1971

1 seul cas en 1972, au voisinage de la frontière française, correspondant d'ailleurs à une commune contaminée de notre pays.

La France était pratiquement indemne depuis des dizaines d'années * lorsque la rage était pour la première fois diagnostiquée chez nous le 28 mars 1968 par l'Institut Pasteur de Paris sur un renard tué à Montenach (Moselle) près de la frontière allemande.

L'enzootie gagna en tache d'huile selon des modalités imposées par la géographie physique et humaine (fleuves difficiles à franchir, massifs forestiers augmentant la perméabilité, agglomérations importantes faisant obstacle à contourner, etc...). A cet égard, les travaux de STRADY (1972) et de LAURENT (1972) qui viennent compléter dans le temps l'analyse fondamentale, à laquelle il faut toujours se reporter, de TOMA et ANDRAL (1970), donnent d'excellentes indications sur les facteurs zoologiques, écologiques, géographiques et autres, qui influent sur le sens et la vitesse de propagation du front de la rage.

Ainsi que l'a confirmé STRADY (1972), la vitesse de progression moyenne du front de la rage en France pour les quatre années d'épizootie varie, selon les axes, entre 20 km par an et 46 km par an.

L'enzootie de rage vulpine touche directement 11 départements français (voir la figure n° 1 page 14). Nous entendons par là que nous ne rattachons pas à cette même rage les cas aberrants qui sont de temps à autre constatés en divers points du territoire et qui, en réalité sont provoqués par des importations de chiens d'Outre-Mer ou même par des transactions commerciales de bovins nés dans les régions contaminées de l'Est **.

Le tableau ci-contre, dû au Centre d'Etudes sur la Rage, présente l'évolution de l'enzootie, année après année, par départements.

* Si l'on excepte toutefois en remontant dans le temps : 1° le cas de rage canine de septembre 1968 dans la Marne, sur un chien venant d'Afrique du Nord ; 2° le cas de rage canine en 1959 dans le Morbihan ; 3° la petite enzootie de rage canine du Sud-Ouest en 1956-1958 ; 4° l'enzootie de rage vulpine de Bourgogne en 1924-1925.

** Tant qu'une législation draconienne, toujours à l'étude en haut lieu, ne viendra pas réglementer les sorties d'animaux des départements contaminés, la santé publique n'est pas à l'abri de toute surprise. On considère à juste titre que le risque humain constitué par un animal rabique est augmenté dans une zone où la maladie est mal connue (manque de précautions, tant de la part du vétérinaire traitant que de celle des éleveurs et de leur personnel).

Années	Départements infectés	Nombre de cas	Détail
1968	3 départements : Moselle, Ardennes, Meurthe-et-Moselle	64	dont 26 renards 30 bovins
1969	5 départements : Moselle, Ardennes, Meurthe - et - Moselle, Meuse, Bas-Rhin	344	dont 200 renards 104 bovins
1970	6 départements : Moselle, Ardennes, Meurthe - et - Moselle, Meuse, Bas-Rhin, Marne	513	dont 299 renards 145 bovins
1971	8 départements : Moselle, Ardennes, Meurthe - et - Moselle, Meuse, Bas-Rhin, Marne, Vosges, Haut-Rhin	897	dont 542 renards 245 bovins
1972 au 31-10	11 départements : Moselle, Ardennes, Meurthe - et - Moselle, Meuse, Bas-Rhin, Marne, Vosges, Haut-Rhin, Haute-Saône, Aisne, Haute-Marne *	822	dont 599 renards 98 bovins

Le tableau suivant récapitule les cas de rage enregistrés par département et par espèces. On y remarquera facilement que les trois départements les derniers infectés (Aisne, Haute-Marne et Haut-Rhin) sont très peu touchés, cela tient au fait que le front de la rage ne les atteint que légèrement par le bord de leur territoire.

Les autorités sanitaires françaises, tant médicales que vétérinaires se sont donc trouvées confrontées avec un problème nouveau dont la gravité n'est pas à nier lorsqu'on sait que la rage déclarée est toujours mortelle.

Fort heureusement, on peut le dire en passant, aucun cas de rage humaine ne s'est produit en France depuis 1968. Les cas de mortalité, rapportés par la presse, correspondaient en fait à des personnes qui, s'étant fait mordre en Afrique, étaient venues mourir dans un hôpital français.

Plusieurs points doivent nous frapper, à la lecture de ces tableaux. La prévalence du renard est incontestable, cette espèce est suivie par les bovins, ensuite le chat, puis le chien et les autres espèces tant domestiques que sauvages.

Sur ce total récapitulatif, le renard compte pour plus de 62 pour 100, les bovins pour 23 pour 100 seulement.

Les conclusions que l'on tire généralement de ces chiffres sont les suivantes. Tout le monde s'accorde pour reconnaître que le renard est bien le « vecteur principal de la rage ». Ceci est déjà un point important.

* Le premier cas de ce département a été diagnostiqué le 3 octobre dernier.

TABLEAU RECAPITULATIF DES CAS DE RAGE ENREGISTRES
DANS L'EST DE LA FRANCE
du 26-03-68 au 31-10-72 *

(Diagnostics effectués par l'Institut Pasteur de Paris, le Centre Antirabique de Strasbourg, le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, le Centre d'Etudes sur la Rage)

	Animaux sauvages					Carnivores		Herbivores et porcs				Totaux
	Renards	Blai- reaux	Che- vreuils	Autres Espèces	Chiens	Chats	Bovins	Ovins Caprins	Equins	Porcins		
Aisne	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	
Ardennes	144	2	—	3	11	12	112	1	2	1	288	
Marne	73	1	—	1	3	5	11	3	—	—	97	
Haute-Marne	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	
Meurthe-et-Moselle	349	6	1	4	12	14	144	9	6	—	545	
Meuse	398	2	6	16	20	28	251	20	7	1	749	
Moselle	148	1	4	6	15	21	104	2	2	—	303	
Bas-Rhin	318	8	13	5	10	11	11	3	1	—	380	
Haut-Rhin	11	—	1	—	—	—	—	—	—	—	12	
Haute-Saône	21	—	—	—	—	—	1	—	—	—	22	
Vosges	199	17	—	2	8	13	4	2	—	—	245	
Totaux	1.667	37	25	37	79	104	638	40	18	2	2.647	

* Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy.

Au second rang nous avons donc les bovins *, espèce domestique dont l'exploitation nécessite des contacts renouvelés avec les personnes qui les soignent. La contagion est apportée aux bovins par la morsure du renard.

Viennent ensuite le chat et le chien, également mis en contact avec le virus rabique par le renard (plutôt que par des batailles entre congénères).

Si nous examinons cette fois le rôle joué par les différentes espèces animales dans la contamination de l'homme, nous n'avons à notre disposition que les chiffres publiés fort à propos par le Centre Antirabique de Reims (STRADY, 1972) ; cette publication éclaire parfaitement l'importance relative des diverses espèces dans la contamination humaine et, ce qui est également très intéressant, dans les contaminations collectives.

	Bovins	Chats	Chiens	Renards	Autres
Nombres d'animaux responsables de traitements humains :	28	7	3	0	1
Nombre de personnes traitées en tout :	70	11	7	0	2

On se rend compte ici que les bovins l'emportent de loin ; en effet 28 bovins enrégés ont entraîné le traitement de 70 personnes, lesquelles représentent les 77 pour 100 de l'ensemble des personnes traitées par STRADY.

En somme la rage qui était autrefois une zoonose « accidentelle » est devenue principalement une zoonose « professionnelle » puisqu'elle passe le plus souvent par les bovins pour parvenir jusqu'à l'homme. Ceci est un peu particulier à notre pays. On a pensé que cette singularité pouvait être expliquée par les habitudes d'élevage françaises, par rapport à ce qui se passe en Allemagne par exemple. En France, les bovins passent une bonne partie de l'année en pâturage, plus ou moins permanent, on les y laisse même pendant la nuit. Les occasions de contamination par les renards sont ainsi multipliées.

* Notons que ce total de 638 bovins ne doit pas nous en imposer. Nous plaçant sur le plan de l'économie agricole stricte, nous pouvons dire que la rage a une incidence pratiquement nulle, puisque le cheptel total de l'espèce bovine existant dans l'actuelle zone rabique de notre pays est d'environ 1 million et demi de têtes. Ce n'est donc pas là que se situe la gravité de la rage, ainsi que nous allons le voir immédiatement.



FIGURE 1. — Le front de la rage à la fin de 1972

Quoi qu'il en soit la maladie est suffisamment grave pour que des mesures énergiques soient prises en vue d'en limiter l'extension et d'en réduire la fréquence.

Nous n'avons pas à traiter ici des moyens qui s'offrent aux autorités pour lutter contre la rage, nous les citerons brièvement toutefois avant d'envisager, comme faisant partie intégrante des mesures prophylactiques, l'information exacte du public et surtout du corps médical ; cette information comporte nécessairement à la base le collationnement de diagnostics certains et l'établissement d'une carte de la rage.

1.2.1. Organisation administrative et technique de la lutte contre la rage (ANDRAL, 1972)

En France, la lutte contre la rage est articulée ainsi qu'il suit :

1° Il existe un Bureau de la Rage à la Direction des Services Vétérinaires au Ministère de l'Agriculture à Paris.

2° La Direction Départementale de l'Agriculture et la Direction des Services Vétérinaires de chacun des départements prennent les mesures locales nécessaires et font appliquer les réglementations nationales.

3° Une Entente Interdépartementale de Lutte contre la Rage, associant les Conseils Généraux des départements concernés a été créée ; elle groupe 7 départements qui sont : les Ardennes, la Meurthe-et-Moselle, la Meuse, le Haut-Rhin, la Haute-Saône, le Territoire de Belfort et les Vosges. Cette Entente devra mettre sur pied une action concertée et aura plus de poids vis-à-vis des Pouvoirs publics que chacun des départements pris isolément.

4° Une Commission interministérielle de Lutte contre la Rage a été réunie sur le plan national, sous la présidence d'un Inspecteur Général de l'Agriculture. Elle comprend, outre les représentants de plusieurs services du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, un représentant de chacun des Ministères suivants : Ministère de l'Intérieur, Ministère de la Santé Publique, Ministère chargé de la Protection de la Nature et de l'Environnement, Ministère chargé de la Défense Nationale.

1.2.2. Prophylaxie employée

Actuellement la lutte contre la rage vulpine repose sur les mesures suivantes :

1.2.2.1. Lutte contre le vecteur sauvage

1° Incitation à la chasse au renard au moyen de distribution de primes : 15 francs par renard abattu hors de la période de chasse et 10 francs lorsque la chasse est ouverte.

2° Empoisonnement des renards en période hivernale par la confection, aux frais de l'Etat, de charniers contenant des gobes empoisonnés à la strychnine.

3° Gazage des terriers de renards à l'aide de chloropicrine, mise gratuitement à la disposition des Fédérations Départementales de Chasseurs *.

Cent à cent vingt mille renards sont ainsi détruits chaque année sur l'ensemble du territoire, dont 20 à 25.000 dans les 11 départements directement concernés. En 1971, l'ensemble de la prophylaxie de la rage a nécessité une participation financière de l'Etat de :

1.969.129 francs.

1.2.2.2. Prophylaxie sur les animaux domestiques

1° Lutte contre les chiens et chats errants. Contrôle des fourrières et des refuges. Interdiction pour ces organismes de « replacer » les carnivores domestiques trouvés ou abandonnés.

2° Vaccination des chiens et des chats fortement recommandée dans les zones contaminées. Vaccination obligatoire pour les chiens de berger et de chasse utilisés dans ces régions.

3° Vaccination des herbivores domestiques fortement recommandée également. Cette immunisation peut se faire en même temps que la vaccination annuelle contre la fièvre aphteuse, grâce à un vaccin associé.

La prophylaxie par la vaccination des animaux domestiques n'a pas pour effet de stopper, ni même de ralentir, la marche de l'enzootie ; elle ne vise strictement qu'à éviter aux humains d'être en contact avec le virus et à faire ainsi l'« économie » de nombreux traitements. Nous allons voir plus loin pourquoi il est intéressant d'éviter le plus possible les traitements humains.

1.3. Nécessité et importance du diagnostic au laboratoire

Traditionnellement, le diagnostic de la rage reposait sur la recherche des signes cliniques. Nos prédécesseurs n'avaient à leur disposition que l'examen du comportement et des symptômes des animaux. Ils avaient parfaitement reconnu, chez tous les animaux domestiques, les diverses formes de la rage, ils avaient insisté sur les signes cardinaux permettant le diagnostic. De nos jours ces données gardent certes toute leur valeur, spécialement lorsqu'il s'agit d'un animal vivant qui vient de contaminer une personne, le cas typique étant celui du chien mordeur. Dans une telle circonstance, les 15 jours

* On peut dire que tant que le Ministère de la Santé publique n'autorisera pas en France l'usage d'un gaz cyanhydrique beaucoup plus toxique que la banale chloropicrine, nous ne parviendrons pas à réduire suffisamment les populations vulpines. C'est par ce moyen que la Belgique est parvenue au succès (voir la note de la page 9). Certes, l'emploi de ce gaz doit se faire dans des conditions bien précises (port d'un masque et de gants, entre autres) par des équipes entraînées et disciplinées ; mais finalement aucun accident n'a été enregistré chez nos voisins qui l'ont employé sur une large échelle dans toute la portion est de leur territoire.

d'observation vétérinaire prescrits par la loi permettent de se rendre compte si l'animal présente ou non des signes de rage ou des signes pouvant être rapportés à la rage, auquel cas il est encore temps de faire commencer le traitement vaccinal curatif de la personne mordue.

Lorsqu'il s'agit d'un animal qui meurt immédiatement après la contamination ou lorsque cette contamination s'est faite à partir d'un cadavre, il faut nécessairement l'intervention du laboratoire.

Au surplus l'observation des signes cliniques sur l'animal domestique vivant peut n'être pas suffisante pour asseoir avec certitude un diagnostic.

Certes, la connaissance directe que les vétérinaires français ont acquise de la rage des animaux domestiques est venue heureusement compléter « les descriptions didactiques classiquement et trop rapidement offertes dans des cours magistraux », ainsi que s'exprime avec humour notre Maître le Professeur GORET (1969). Malheureusement il semble que plus on connaisse la rage, plus on se rende compte que le diagnostic clinique en est ardu, sans que pour autant on puisse parler de cas atypiques, ainsi qu'il est parfois très tentant de le faire. GORET conclut ainsi sa note sur la symptomatologie de la rage bovine au cours de l'actuelle enzootie française : « Les symptômes de la rage bovine actuellement observée en France n'ont rien d'atypiques et sont depuis très longtemps décrits par les classiques dans tous leurs détails. Ils ne font que traduire l'extrême diversité des aspects de cette redoutable virose neurotrope qu'en période d'enzootie, il importe de toujours suspecter ». Quant à HARNETIAUX (1972), toujours à propos de la rage des ruminants dont il a observé 30 cas dans sa clientèle en l'espace de quelques mois, il insiste sur le caractère protéiforme de la maladie et ne parvient pas, malgré son expérience et la précision de ses descriptions, à indiquer quelques signes qui seraient pathognomoniques. Il en est également ainsi pour EIKMEIER (1970). Nous-même enfin (VIL-LEMIN, 1972), rassemblant les observations cliniques réalisées par nous et par d'autres confrères, avons essayé de décrire la rage des Equidés et de mettre en lumière des symptômes diagnostiques ; force nous a été de constater que souvent, la rage prend dans cette espèce l'allure de coliques abdominales, ce qui ne facilite en aucune manière le diagnostic clinique.

Il existe en outre d'autres encéphalites virales ou bactériennes chez nos animaux, voire certaines intoxications ou certaines névroses métaboliques, dont les signes sont très voisins de ceux de la rage. Il est donc important que le laboratoire soit saisi d'une demande de diagnostic sur le cadavre afin que la suspicion clinique du praticien soit confirmée de façon certaine.

Le laboratoire doit également intervenir dans le cas de découverte d'un cadavre d'animal sauvage en l'absence de toute contamination, de manière à pouvoir dresser et tenir à jour, commune par commune, la carte épidémiologique de la rage. Cette mise à jour est faite à partir des données reçues des deux autres laboratoires de diagnostic du territoire métropolitain (service de la Rage de l'Institut Pasteur de Paris et Centre de Traitement Antirabique de Strasbourg) et de nos propres diagnostics. Un Bulletin Epidémiologique Mensuel est diffusé par le Centre d'Etudes sur la Rage et adressé à 50 correspondants en France et 10 à l'étranger (Centres Antirabiques, Autorités Vétérinaires Gouvernementales, Instituts de Recherches, O.M.S., F.A.O., etc...).

Cette carte épidémiologique, ou mieux épizootologique (puisque l'on s'agit exclusivement d'animaux), est très importante à établir et à modifier en fonction de l'actualité. C'est elle seule qui permet au médecin du Centre Antirabique de prendre une décision de traitement ou d'abstention de traitement lorsqu'il se trouve en face d'une éventuelle contamination grave par un animal inconnu ou en fuite. Elle est l'un des éléments qui facilite, au médecin, ce que GAMET (1971) appelle « l'appréciation correcte du risque rabique ».

Si l'affaire s'est passée loin du front de la rage et qu'il n'existe aucune possibilité que l'animal suspect de rage ait été en contact direct avec des animaux provenant de la région connue comme étant infectée de rage, il peut prendre la responsabilité de s'abstenir de faire le traitement.

En dehors de ces cas extrêmes où l'animal qui a mordu est inconnu ou en fuite, le médecin du Centre Antirabique préfère toujours avoir la possibilité de se référer à une carte de la rage tout à fait à jour, il peut ainsi modifier son schéma thérapeutique avec davantage de chances de succès.

Comme l'indique STRADY (1972) : « Une distinction doit être faite entre le consultant venant d'une zone franchement éloignée de l'enzootie et le consultant venant de la zone contaminée. Si le schéma (de traitement) doit être appliqué strictement dans le deuxième cas, nous pensons qu'il faille le nuancer pour le premier ».

On peut alors se demander pourquoi le médecin responsable éprouve tant de difficultés et s'entoure de tant de précautions avant de décider d'entreprendre une vaccination thérapeutique. C'est tout simplement, il ne sert de rien de le cacher, qu'il doit en réalité apprécier et mettre en balance deux risques bien différents : 1° le risque pour son malade de faire la rage ; 2° le risque de la vaccination. Car il faut bien reconnaître que malgré les énormes progrès qu'on a fait faire au vaccin antirabique depuis l'époque pastorienne, les accidents ne sont pas totalement absents. Il ne s'agit aucunement d'une rémanence de la virulence (on sait parfaitement inactiver le virus),

ni d'une contamination a posteriori du vaccin préparé ; il s'agit de l'existence dans le produit injecté d'un facteur d'immunisation allergique qui n'est autre que la substance nerveuse qui a servi de support à la répllication virale in vivo (CAQUEL, 1971 ; ROHMER et ses coll., 1971). Le choix du souriceau nouveau-né, à la place du mouton adulte, a déjà grandement réduit ce risque *, mais il ne l'a pas amené à néant. Les accidents, transitoires pour la plupart, consistent en méningomyélites, méningoencéphalomyélites ou paralysies périphériques. C'est la raison pour laquelle ROHMER et ses collaborateurs (1971) s'expriment de la façon suivante : « Etant donné la gravité de ces accidents, il est judicieux de ne vacciner que les sujets véritablement exposés ou contaminés ».

Enfin la carte épizootologique de la rage ne permet pas seulement des mesures hygiéniques individuelles, mais également la mise en route des mesures de police sanitaire et de prophylaxie utiles à la protection de la collectivité que nous avons vues page 15. Ces moyens de prophylaxie sont progressivement étendus en fonction de l'avance du front de la rage.

L'étude de la carte ne dispensera pas de l'appréciation de facteurs locaux (la densité des renards en particulier) qui peuvent faire évoluer la marche de l'enzootie de façon quasi imprévisible, mais elle constitue une bonne base et fournit un bon outil de travail.

Il importe donc que la situation soit connue au jour le jour et pour cela que de nombreux diagnostics épizootologiques ou encore « vétérinaires » soient effectués sans relâche.

2. LES CONDITIONS DU TRAVAIL AU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE DE NANCY

2.1. Le personnel

Le service du diagnostic dont nous avons eu la charge est composé de quatre agents de laboratoire qui ont été formés sur place, sans compter le secrétariat et le service d'entretien qui sont communs à l'ensemble du Centre.

Chacun d'entre eux a une tâche qui lui est plus particulière, mais il a toujours été entendu que chacun devait être capable de faire l'ensemble du travail préparatoire aux diagnostics.

Cette polyvalence exigée du personnel peut paraître abusive ; l'expérience prouve, au contraire, qu'elle est parfaitement admise par tous. Nous voyons à cela deux raisons principales : d'abord la possibilité d'un travail plus varié qu'avec une étroite spécialisation ; en second lieu la satisfaction morale donnée par l'accomplissement total d'un diagnostic complexe.

* Le cerveau des animaux qui viennent de naître ne contient pas de myéline, laquelle a été considérée comme responsable des accidents neurologiques. Au surplus l'encéphale des jeunes renferme davantage de virus, ce qui permet de fabriquer un vaccin dont la concentration en tissu nerveux est plus réduite (2 pour 100 au lieu de 5 pour 100 avec le mouton).

Dans ces conditions, le service peut fonctionner sans à-coup en cas d'absence de l'un ou de l'autre ; enfin il s'est créé un esprit d'équipe, dont nous avons parlé dans l'avant-propos, qui nous paraît tout à fait indispensable à la réalisation correcte de la tâche, somme toute délicate, qui nous est dévolue.

2.1.1. La protection du personnel

Tout le personnel du Centre d'Etudes sur la Rage, à l'exception du personnel administratif, est vacciné contre la rage grâce au nouveau vaccin de l'Institut Pasteur *. Ce vaccin est préparé par le Docteur GAMET à partir de cerveaux de souriceaux nouveau-nés. Le virus est totalement inactivé par la bétapropiolactone ; il est présenté sous forme lyophilisée. Il s'administre par voie intradermique stricte, dans la peau de l'avant-bras trois fois à trois semaines d'intervalle, puis en rappels annuels. Aucun incident n'a été constaté en dehors d'une rougeur parfois accompagnée de prurit local. La sérologie permet de suivre la courbe montante des anticorps neutralisants (LEPINE P. et coll., 1971 ; GAMET A., 1971). Voici ce qui a été noté chez nous :

Après une primo-vaccination le titre des anticorps du personnel se situe entre 1/182 et 1/230.

Après deux rappels entre 1/1180 et 1/1600, après trois rappels il peut monter jusqu'à 1/3125, l'épreuve sur souris étant faite avec une moyenne de 45 à 50 DL50 de C.V.S. (Challenge Virus Strain). Un membre du personnel s'étant contaminé par piqûre avec une aiguille chargée de matériel virulent alors qu'il était en cours de vaccination préventive, a reçu au Centre de Traitement Antirabique de Nancy les 14 injections du traitement classique, plus deux rappels intradermiques ; le titre en anticorps de cette personne est à présent de 1/1380 avec 47 DL 50 de C.V.S.

En dehors de cette protection vaccinale, dont en vérité nul ne connaît exactement la valeur, le personnel manipule en salle d'autopsie avec des gants de plastique, dans le box d'autopsie avec des gants fins en caoutchouc (à usage unique) ainsi que dans le box d'inoculation et l'animalerie.

A chacun de ces postes de travail, le personnel doit porter des lunettes, ceux qui n'en usent pas habituellement, chaussent des lunettes de protection du type industriel.

Enfin l'emploi des désinfections manuelles répétées en cours de journée est vivement conseillé. Le matériel (table d'autopsie, paillasse) est désinfecté à l'eau de Javel diluée, les mains aux ammoniums quaternaires. Les lavages au savon ordinaire sont également recommandés.

* Ce vaccin n'a pas encore reçu l'autorisation nécessaire à sa commercialisation, il est toujours pratiqué par le médecin-expérimentateur désigné (Pr. A. GAMET) et uniquement sur des personnes reconnues comme réellement exposées de par leur profession.

2.2. Le bâtiment (voir la figure n° 2)

Le Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy est installé dans un bâtiment neuf, construit spécialement pour cet usage, sur le domaine de Pixérécourt, commune de Malzéville.

Le premier étage abrite les bureaux de direction et d'administration, une salle de réunion-bibliothèque et les laboratoires de la section d'écologie.

Au rez-de-chaussée se trouve le laboratoire de diagnostic. Le plan ci-après avec sa légende donne la disposition des diverses pièces. La surface utilisable est de 200 mètres carrés.

La seule particularité qui nous retiendra ici est la trappe qui permet l'entrée des prélèvements dans la chambre froide à toute heure du jour et de la nuit.

De l'animalerie et du box à inoculations il sera parlé plus loin, à propos de l'inoculation aux souris.

Les paillasses sont en matériau synthétique appelé « pyro-céram » formant de grandes plaques unies de couleur coquille d'œuf. Le gaz, l'eau et l'électricité se trouvent distribués un peu partout.

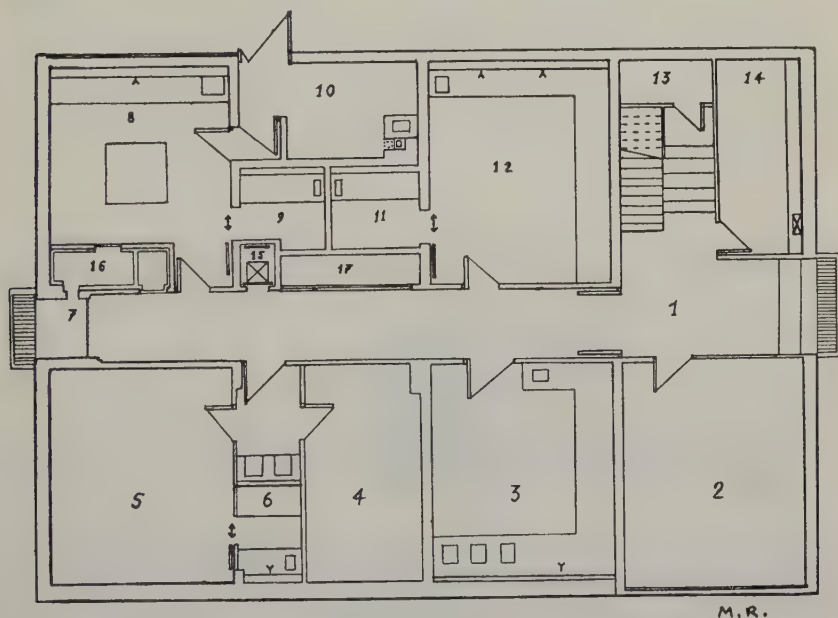


FIGURE 2

1 : le hall d'entrée ; 2 : la réception - secrétariat ; 3 : l'histologie ; 4 et 5 : l'animalerie ; 6 : le box d'inoculation ; 7 : la trappe de dépôt ; 8 : la salle d'autopsie ; 9 : le box d'autopsie ; 10 : l'incinérateur ; 11 : le box des microscopes ; 12 : le laboratoire général ; 13 : le palier du sous-sol ; 14 : la réserve ; 15 : le monte-charge (50 kg) ; 16 : la chambre froide ; 17 : la niche du réfrigérateur et du congélateur.

3. LES TECHNIQUES DU DIAGNOSTIC

3.1. Généralités

Les techniques de diagnostic mises en œuvre au Centre d'Etudes sur la Rage n'ont rien d'original ; sur quelques points cependant, nous avons apporté quelques modifications de détail ; nous les envisagerons chemin faisant.

Les méthodes de diagnostic de la rage sont celles qui sont préconisées par l'O.M.S. dans sa monographie n° 23, intitulée « La rage - Techniques de laboratoire » dont la seconde édition est parue à Genève en 1967. La haute tenue de cet ouvrage de 184 pages, due à la qualité des 13 co-auteurs, en fait l'ouvrage de base de tous ceux qui, à un titre ou à un autre, s'occupent de rage au laboratoire.

3.1.1. Méthodes de diagnostic à résultat rapide

Il s'agit d'abord de l'examen spécifique en immunofluorescence qui repose sur l'emploi de deux sortes de conjugués antirabiques fluorescents (GOLDWASSER et KISSLING, 1958 ; McQUEEN, LEWIS et SCHNEIDER, 1960). Ensuite on range dans ce groupe la coloration de SELLERS (1927) qui donne un résultat en quelques minutes, mais est beaucoup moins sensible et fidèle que la précédente.

3.1.2. Méthode de diagnostic à résultat moins rapide

Ce sont les techniques de l'histopathologie. Elles consistent à rechercher sur des coupes microscopiques, après coloration, la présence des corps de Negri. Le résultat est obtenu en 48 heures, grâce aux moyens que nous mettons en œuvre.

3.1.3. Méthode de diagnostic à résultat différé

L'inoculation aux souris est pratiquée le lendemain de l'arrivée des prélèvements. Un résultat positif est obtenu entre 7 et 21 jours ; un résultat négatif au bout de 28 jours.

Dans tous les cas, et quel que soit le résultat des épreuves rapides, les autres techniques sont mises en œuvre à chaque fois. Bien entendu, il est des cas où l'état de conservation des prélèvements interdit certaines opérations. Le plus souvent c'est l'histologie et le Sellers qui sont impossibles ; à un degré d'altération encore plus marqué l'immunofluorescence devient illusoire. Reste donc toujours l'inoculation, sauf lorsque l'animal nous est amené vidé de sa substance cérébrale, ce qui a parfois été le cas lorsqu'il avait été abattu d'un coup de feu en pleine tête.

3.2. Techniques préparatoires communes aux quatre examens

3.2.1. Réception et exploitation des prélèvements

Nous n'insisterons ici que sur les points qui sont particuliers à la recherche de la rage.

Le seul organe qui nous intéresse pour le diagnostic de routine est l'encéphale. Nous le recevons, soit déjà extrait de la boîte crânienne, ce qui est assez rare, soit sous forme de la tête entière du cadavre.

Le transport doit se faire dans les meilleurs délais et sous emballage isotherme étanche muni de sachets de glace, en évitant tout autant la congélation que le réchauffement.

A cet égard, les boîtes en polystyrène expansé sont tout à fait convenables. On obtient même leur étanchéité en garnissant la jonction entre la boîte et le couvercle d'un ruban de plastique auto-collant. Le prélèvement lui-même doit être emballé dans au moins un sac de plastique fermé par un nœud et la boîte doit renfermer une substance absorbante (du type de la sciure de bois). On trouve dans le commerce des sachets en matière plastique assez forte qui renferment environ 30 ml d'eau ; il est aisé de faire congeler ces sachets en vue d'une expédition ; une fois décongelés ils ne coulent pas dans l'emballage.

La boîte crânienne est ouverte au marteau et au rogne-pied. Le cerveau est placé sur une boîte de Pétri sans couvercle ou une assiette en carton plastifié portant le numéro d'enregistrement du cas, tel qu'il est établi dans le registre chronologique des entrées.

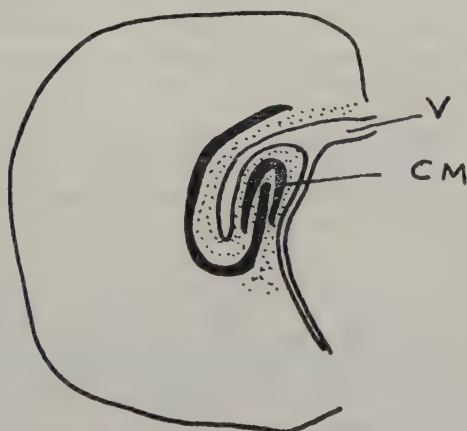


FIGURE 3

Schéma d'un hémisphère gauche vu en coupe transversale. On distingue le double enroulement des couches de cellules pyramidales et de cellules ganglionnaires formant la corne d'Ammon.

V = Cavité du troisième ventricule

CM = Couche moyenne des neurones ganglionnaires

Dans le box attenant à la salle d'autopsie, le cerveau est disséqué. On prélève la corne d'Ammon ainsi qu'un fragment de cervelet, de bulbe et de cortex.

La corne d'Ammon est un relief cylindroïde, une sorte de circonvolution interne qui fait saillie sur le plancher du ventricule latéral de chacun des hémisphères cérébraux. En avant, la corne d'Ammon est en contact avec son homologue de l'autre hémisphère, puis les deux cornes s'écartent l'une de l'autre à mesure qu'elles se dirigent vers l'arrière. Pour découvrir une corne d'Ammon, il faut faire une incision au bistouri d'avant en arrière, parallèlement à la scissure interhémisphérique, à quelque distance de celle-ci. L'incision peut aller en s'écartant du plan médian pour suivre le trajet de la corne d'Ammon. On incise la substance grise, puis la substance blanche jusqu'à pénétrer dans le ventricule latéral. La corne d'Ammon se présente sous la forme d'un boudin, de couleur nacré, recourbé en arrière vers le bas, bien isolé du reste, sauf en sa partie inférieure. Sa section présente un double enroulement visible à l'œil nu, qui est absolument caractéristique ; l'une des couches est la couche centrale de cellules pyramidales, l'autre est la couche moyenne formée des neurones ganglionnaires. Cet aspect se retrouve, avec des variantes mineures, dans toutes les espèces animales (voir la figure 3).

Une petite section de corne d'Ammon (de 5 à 6 mm de long), ainsi qu'un fragment de cervelet sont placés dans un pilulier rempli de liquide fixateur de Bouin en vue de l'histopathologie (paragraphe 3.5.2.). Un autre échantillon de chacune des localisations est déposé dans un tube en polystyrène stérile pour être conservé comme archives au congélateur à -30° .

Une autre section de corne d'Ammon de quelques millimètres d'épaisseur est déposée sur l'extrémité d'un abaisse-langue en bois de manière à ce que soit exposée la surface de la coupe. En y appuyant légèrement la lame histologique, on réalise facilement les calques.

Deux séries de lames sont ainsi réalisées. L'une sur des lames préparées spécialement comme nous le verrons à propos de l'immunofluorescence (paragraphe 3.3.2.1.), l'autre sur des lames ne portant que le numéro du cas et qui serviront à la coloration de Sellers (paragraphe 3.4.).

Pour finir, un fragment de corne d'Ammon ayant un volume d'environ 1/2 ml est mis dans un mortier stérile en pyrex avec pilon pour permettre la préparation du broyat et de l'inoculum en vue du diagnostic biologique par inoculation aux souris (paragraphe 3.6.2.1.).

L'abaisse-langue, la boîte de Pétri ou l'assiette en carton ne servent qu'une fois. Comme les gants en caoutchouc, il sont jetés à la fin de la série de manipulations. Les mortiers et leurs pilons sont immédiatement désinfectés par ébullition (pour détruire le virus), ils seront stérilisés ensuite à l'autoclave.

3.2.2. Prélèvement et étude de la seule corne d'Ammon

Il est classique de faire porter les examens par coloration de Sellers, sur des calques de corne d'Ammon et de cortex ; les examens en immunofluorescence sur des calques de bulbe, de cervelet, de corne d'Ammon et de cortex ; les examens histopathologiques sur des échantillons des mêmes régions de l'encéphale.

C'est ainsi qu'au début de nos travaux, nous avons procédé. Certains laboratoires ajoutent même à ces examens de routine, l'examen des glandes salivaires sous-maxillaires et celui du ganglion de Gasser. Tout comme les autres chercheurs nous avons rapidement remarqué que lorsque l'antigène rabique (vu à l'immunofluorescence) ou les lésions spécifiques du virus (vues à la coloration de Sellers et à l'histologie) est présent dans le bulbe, dans le cervelet ou dans le cortex, cela s'accompagne de très nombreuses images de positivité dans la corne d'Ammon ; par contre, il arrive souvent que les images positives soient assez rares dans la corne d'Ammon, auquel cas elles sont absentes dans les autres portions de l'encéphale. L'inverse au contraire ne se produit jamais.

Il nous est donc apparu qu'il était inutile de faire systématiquement l'examen du bulbe, du cervelet et du cortex et qu'il était plus économique de se limiter à la seule corne d'Ammon.

Bien entendu, nous admettons volontiers que cette simplification ne constitue pas un progrès en soi et qu'elle est surtout valable en l'état actuel des choses pour des diagnostics épizootologiques de routine, les seuls dont nous soyons chargés.

C'est donc sur l'une des cornes d'Ammon (ou sur les deux lorsqu'il s'agit d'une espèce de petite taille) que nous prélevons l'échantillon destiné à être conservé en archives, le prélèvement placé dans le liquide de Bouin destiné à l'histopathologie, le fragment servant à réaliser les calques, ainsi que celui qui sera broyé au mortier en vue de l'inoculation.

C'est seulement lorsque le prélèvement est en mauvais état (autolyse, putréfaction, destruction du tissu nerveux par traumatisme ou coup de feu) que nous utilisons, faute de mieux, un fragment de bulbe, de cervelet, ou de cortex, voire de moelle cervicale, l'ordre suivi dans notre énumération étant l'ordre préférentiel décroissant.

Nous venons de voir réalisées les opérations préliminaires au diagnostic en général.

Il convient à présent de voir avec quelques détails les quatre techniques du diagnostic.

3.3. L'immunofluorescence

3.3.1. Généralités

L'immunofluorescence est une méthode spécifique basée sur le marquage des réactifs immunologiques par un composé fluorescent ; ce composé éclairé par certaines radiations lumineuses émet de nouvelles radiations différentes des précédentes et ce sont ces nouvelles radiations que l'on observe au microscope (FAURE, 1970).

En matière de rage, ce sont les anticorps qui sont marqués, l'antigène quant à lui est éventuellement présent dans le calque de la substance cérébrale à examiner. On pratique l'immunofluorescence directe, c'est-à-dire qu'on applique directement le sérum immun sur l'antigène ; les globulines anticorps fluorescentes se fixent sur l'antigène lorsqu'il est présent, les autres globulines non anticorps, mais également fluorescentes sont éliminées par un lavage.

Cette technique est spécifique et très sensible. Sa spécificité ne repose pas seulement sur la coloration caractéristique obtenue mais également sur la morphologie des corpuscules que l'on découvre ; sa sensibilité est grande puisque quelques rares corpuscules sur un calque permettent le diagnostic ; elle est rapide enfin, car quelques heures après la réception d'un prélèvement, on peut déjà avoir une réponse.

La méthode a cependant des limites comme nous le verrons plus loin.

3.3.2. Le matériel nécessaire

3.3.2.1. Les lames histologiques

Il s'agit de lames d'une épaisseur de 8 à 10 dixièmes de millimètres sur lesquelles on trace, grâce à un diamant et une boîte faisant office de pochoir, 2 cercles d'environ 12 mm de diamètre, distants l'un de l'autre de 15 mm ; on ménage à l'une des extrémités un peu plus de place pour y graver le numéro du cas. Les cercles sont destinés à permettre une localisation facile des calques, pour leur coloration et aussi pour leur lecture ultérieure.

L'épaisseur des lames est en vérité sans importance pour l'examen avec un microscope à réflexion puisque la lumière ne franchit somme toute que la lamelle. Avec un microscope en lumière transmise, il est impératif, pour une bonne lecture, de n'utiliser que des lames minces ; celles de 8 à 10 dixièmes sont tout à fait satisfaisantes.

3.3.2.2. Le conjugué antirabique

Envisager la préparation du sérum marqué à la fluorescéine nous entraînerait beaucoup trop loin. Rappelons simplement le principe des manipulations.

On utilise l'isothiocyanate de fluorescéine. Ce composé a la faculté de se combiner avec les protéines, en l'occurrence celles du sérum brut de cheval hyperimmunisé * contre la rage, de titre élevé en anticorps ; une fois celui-ci débarrassé de ses albumines, on dose ses protéines de manière à introduire dans la solution de globulines la proportion d'isothiocyanate voulue.

Le mélange renferme alors les globulines liées à la fluorescéine, un excès d'isothiocyanate de fluorescéine ainsi que d'autres produits de décomposition et de polymérisation de l'isothiocyanate. Ces produits qui viendraient fausser la réaction sont éliminés par fractionnement sur colonne de Séphadex G. 50 (FAURE, 1970 ; ATANA-SIU, 1970).

La globuline antirabique marquée que l'on appelle alors conjugué antirabique se conserve parfaitement sous forme lyophilisée.

L'Institut Pasteur de Paris fournit un conjugué antirabique d'excellente qualité. Deux présentations sont commercialisées. La suspension A est complétée par une émulsion à 20 % de cerveau de souris normale, tandis que la suspension B l'est par une émulsion de cerveau de souris rabique (inoculées avec du Challenge Virus Strain).

La commodité de la présentation lyophilisée est certaine puisqu'il suffit d'ajouter au flacon, tel qu'il est livré, 3 ml d'eau distillée stérile ; une fois cette solution opérée le produit se conserve plusieurs jours à + 4° sans perdre aucunement de son efficacité.

3.3.2.3. Les microscopes nécessaires à l'immunofluorescence

Nous disposons de deux microscopes équipés pour l'examen en fluorescence.

Le premier est un microscope ORTHOPLAN LEITZ qui fonctionne en lumière réfléchie grâce à l'optique de PLOEM. La lumière est émise par une lampe à vapeur de mercure HBO 500 W/4 ; on utilise un filtre d'excitation BG 12 de 5 millimètres, bleu ; l'optique de PLOEM comporte un miroir TK 495 nm et un filtre d'arrêt K 495 nm ainsi qu'un filtre K 510 dans la fente. L'objectif le plus couramment employé est le 40/0,65 avec oculaires $\times 8$.

Avec ce type d'éclairage, la lumière est envoyée par l'objectif lui-même sur la lame porte-objet, elle se réfléchit sur le calque pour revenir, grâce au miroir séparateur, dans les oculaires.

* L'hyperimmunisation est obtenue par emploi de la souche de virus fixe Pasteur entretenue sur cerveau de lapin ou en culture cellulaire.

Le second est un microscope DIALUX LEITZ qui fonctionne en lumière transmise ordinaire produite par une lampe de quartz aux halogènes 7023, 12 v, 100 W. Le filtre d'excitation est un KP 490. L'optique est munie d'un filtre K 510 dans la fente. Ici également l'objectif le plus couramment employé est le 40/0,65 avec oculaires $\times 10$. Le condenseur est à fond noir.

L'avantage du DIALUX par rapport à l'ORTHOPLAN, qui bien entendu lui est supérieur sous le rapport des performances, réside dans le fait qu'il est possible de faire des examens en fluorescence aussi fréquents qu'on peut le désirer, car la lampe aux halogènes s'allume instantanément et peut être rallumée alors qu'elle est chaude. Au contraire la lampe à vapeur de mercure doit être mise sous tension environ 15 minutes avant l'emploi et il est impossible de la rallumer tant qu'elle n'est pas refroidie.

3.3.2.4. Le local d'examen

Le local où se trouvent les microscopes est une chambre noire. S'il n'est pas exactement indispensable que l'obscurité soit absolue, on constate que plus elle est intense, plus les examens sont faciles et moins l'observateur éprouve de fatigue lorsque le nombre des lames à lire est élevé. Cette règle générale de la microscopie est encore plus valable dans l'examen en fluorescence, car il y a finalement très peu de lumière dans l'oculaire et l'œil doit être habitué à l'obscurité.

3.3.3. Réalisation de l'immunofluorescence

Le matériel étant mis en place, voyons le détail de la technique. Nous avons laissé les calques de corne d'Ammon sécher sur lame dans le box d'autopsie. Lorsque les calques sont bien secs, ce qui demande 15 minutes, on les plonge dans l'acétone pure à -20° , c'est-à-dire sortant du congélateur. La durée de ce bain fixateur est d'au moins 20 minutes, mais il peut se prolonger jusqu'à 24 heures sans inconvénients.

Ensuite, les lames sont sorties et on laisse évaporer l'acétone.

Sur le calque placé dans le cercle le plus proche du numéro gravé (par convention), on met une goutte du conjugué A (avec émulsion de cerveau de souris normale). Sur le second cercle on met une goutte de conjugué B (avec émulsion de cerveau de souris rabique).

On met les lames à l'étuve humide à 37° , pendant au moins une demi-heure dans une boîte en plexiglass renfermant une compresse humide.

Si les calques contiennent de l'antigène rabique, que se passe-t-il ?

Sur le calque déposé dans le cercle le plus proche du numéro, les globulines marquées à la fluorescéine (conjugué A) se fixent sur les particules antigéniques s'il en existe, c'est une véritable réaction antigène-anticorps qui s'est produite.

Sur le second cercle, les globulines marquées à la fluorescéine (conjugué B) ne peuvent se fixer à l'antigène du calque parce que le conjugué ayant été saturé avec du cerveau de souris rabique, la réaction antigène-anticorps n'est plus possible, c'est le calque témoin négatif.

Après le temps d'étuve les lames sont soigneusement lavées dans une solution tampon phosphatée à pH 7,2 puis dans l'eau distillée.

On laisse ensuite sécher à l'air puis on monte sous lamelle avec de l'Elvanol 51.05 qui sèche rapidement et ne possède pas de fluorescence propre.

3.3.4. La lecture

Les lames sont examinées avec un microscope (au grossissement 320 à 400) pourvu d'une source de lumière dont la longueur d'onde va exciter la fluorescence du produit de marquage. Nous avons vu au paragraphe 3.3.2.3. de quels microscopes nous disposions.

On voit alors, sur un fond noir, une fluorescence en forme de nuages plus ou moins abondants et plus ou moins épais, elle n'a rien de spécifique, elle correspond aux protéines de la substance cérébrale.

Plus la putréfaction est avancée dans le prélèvement d'origine, plus on découvre de plages fluorescentes non spécifiques sur les calques. Cela tient, d'une part à ce que l'état de putréfaction s'accompagne d'une plus grande viscosité de la matière cérébrale d'où une plus grande épaisseur du calque et, d'autre part, à ce que les modifications physico-chimiques constituant l'altération augmentent la fluorescence propre de la substance cérébrale.

Sur le cercle réactif, si de l'antigène rabique est présent, on voit des corpuscules et des granulations vert brillant de toutes tailles, de forme ronde ou ovale. Sur les plus grosses de ces formations, qui correspondent toutes à des agrégats plus ou moins importants de particules virales, on distingue une sorte de cerne plus fluorescent et un contenu un peu plus terne.

Cet aspect n'est pas le fruit d'un artefact dû à l'isothiocyanate de fluorescéine puisqu'avec la nouvelle méthode de mise en évidence de l'antigène rabique décrite par ATANASIU, DRAGONAS et leurs collaborateurs (1971) qui consiste à marquer les anticorps rabiques avec de la peroxydase, on observe également dans la rage des rues (par

opposition à « rage fixe ») « de gros corpuscules colorés en jaune marron, plus foncés à la périphérie ». Ces auteurs concluent d'ailleurs qu'ils n'ont pas trouvé de différence qualitative et quantitative entre la technique de l'immunopéroxydase et celle de l'immuno-fluorescence.

Les plus gros corpuscules ressemblent assez aux corps de Negri que l'on découvre à l'histopathologie. Nous verrons plus loin (page 40) ce qu'il faut penser de cette analogie sommaire. Les plus petits sont de simples amas de virions non structurés à l'échelon cytologique. Il est de fait qu'il n'existe pas de commune mesure entre la grande fréquence des corpuscules fluorescents spécifiques et celle, beaucoup moins élevée, en règle générale, des corps de Negri que montrent les techniques histologiques. On sait par ailleurs que dans certains cas, tout spécialement avec les souches rabiques fixes, la fluorescence spécifique est plus diffuse, elle apparaît sous forme de traînées, de nébuleuses ou de voie lactée.

Tantôt les corpuscules spécifiques sont innombrables dans la préparation, tantôt ils sont rares et peuvent se compter sur les doigts d'une main. Il arrive que les particules fluorescentes spécifiques soient groupées dans des cellules ; plus exactement on devine un contour cellulaire au sein duquel plusieurs corpuscules sont réunis. Ces lames sont les plus faciles à lire.

Parfois la fluorescence est plus faible, le vert obtenu moins intense sans que l'on puisse incriminer la qualité des manipulations, ni celle de l'éclairage, ni celle du conjugué.

Dans certains cas, il existe des fluorescences parasites en forme de corpuscules ; lorsque ces fluorescences non spécifiques, rondes ou ovalaires, sont de taille assez grosse, on peut facilement les distinguer des corpuscules spécifiques par le fait qu'elles ont une teinte verte uniforme sur toute leur surface, sans cerne plus brillant à la périphérie ; elles apparaissent comme plates et amorphes. Cependant lorsque ces fluorescences parasites sont de taille réduite, il peut être ardu de faire la diagnose différentielle, en ce cas l'examen du cercle témoin-négatif peut lever les doutes. Ce calque a été mis en contact avec le conjugué B, il ne peut donc donner de fluorescence spécifique ; en conséquence, si les mêmes taches vertes se trouvent sur le témoin négatif cela signifie que celles qu'on trouve sur l'autre calque ne sont nullement spécifiques. Si par hasard on rencontrait des corpuscules spécifiques sur le calque témoin, c'est qu'il y aurait eu, soit une erreur de manipulation, soit que le titre du virus CVS aurait été trop bas dans le conjugué B. Le conjugué antirabique dans ses deux formes A et B, préparé par le service de la rage de l'Institut Pasteur, nous a toujours donné pleine satisfaction.

La technique de lecture que nous venons de décrire est essentiellement valable lorsqu'on emploie le microscope ORTHOPLAN LEITZ illuminé par une lampe à vapeur de mercure. Il convient ici de donner quelques indications sur la technique de lecture avec le microscope DIALUX LEITZ lequel fonctionne en lumière ordinaire modifiée par un filtre d'excitation KP 490. Sous ce type d'éclairage, la fluorescéine qui s'est fixée spécifiquement aux particules antigéniques présente les mêmes aspects que ceux que nous avons décrits précédemment. Il apparaît cependant une foule d'images parasites de tailles et de formes diverses ; ce peuvent être des bulles de toute petite taille, des formes en points ou en cristaux, etc... ; toutes ces formations se caractérisent par un cerne de diffraction où domine le rouge vif. Il est possible pour éclaircir et faciliter la lecture de faire disparaître tous ces artefacts qui sont, soit des micro-bulles formées dans le milieu de montage, soit des éclats de verre, soit des poussières ; il suffit de placer, en plus du filtre d'excitation KP 490 un filtre BG 38 et à la place du filtre d'arrêt K 510 un filtre d'arrêt K 530. De la sorte on ne distingue plus ces images parasites et l'attention peut davantage se concentrer sur la recherche des corpuscules spécifiques de couleur verte. Signalons enfin un procédé simple et commode qui permet de faire la distinction en cas d'image douteuse, entre une granulation spécifique et une autre formation d'aspect voisin ; il suffit d'enlever un instant les filtres d'excitation : si la fluorescence est spécifique, l'image s'éteint ; si la fluorescence n'est pas spécifique l'image de la granulation reste allumée, mais en couleur blanche. Bien entendu, comme avec l'ORTHOPLAN, on dispose d'une autre possibilité pour asseoir la diagnose ; elle consiste également à examiner les calques témoins négatifs.

Pour en terminer avec le DIALUX, insistons sur la nécessité impérieuse d'un bon réglage du condenseur. Rappelons qu'il s'agit d'un condenseur à fond noir à sec D 0,80. Ce condenseur est muni de deux boutons qui actionnent un dispositif de centrage. Il est indispensable que ce centrage soit parfait, sinon une bonne partie de la lumière qui est envoyée sur la lame porte-objet ne pénètre pas dans l'objectif et les images perdent de leur visibilité. Le réglage en hauteur est également très précis et ne souffre pas d'à peu près.

La technique d'examen en immunofluorescence est « élégante, rapide et fidèle en de bonnes mains », ainsi que s'expriment LE-PINE P. et GAMET A. (1969), qui ajoutent au nombre des facteurs d'un examen correct : « un examinateur expérimenté possédant parfaitement cette technique ».

De leur côté, LENNETTE et EMMONS (1971) insistent sur la nécessité d'un entraînement poussé avant de se lancer dans le diagnostic par immunofluorescence, car ils estiment que les descriptions écrites ou les photographies seules ne sont pas capables de

donner l'expérience pratique de l'examen. Enfin ils sont d'avis que cet examen doit constituer un travail fréquent (journalier si possible) de façon à entretenir l'habileté technique, utile à une bonne interprétation.

3.3.5. La conservation des lames d'immunofluorescence

Les lames d'immunofluorescence se conservent parfaitement. Il est de tradition de les garder à l'abri de la lumière et au congélateur à — 20°. Plus que le temps, c'est l'exposition aux rayons ultra-violets qui affaiblit la fluorescence ; on s'en rend parfaitement compte lorsqu'on laisse une lame sur la platine du microscope éclairé par une lampe à vapeur de mercure. De verte qu'elle est, la fluorescence devient jaunâtre en quelques minutes et cela dans le champ irradié uniquement. Une observation fortuite est venue confirmer que ce n'est pas le froid qui conserve les images spécifiques mais bien l'obscurité ; des lames laissées dans une boîte opaque à la température ambiante dans une automobile avaient gardé leur fluorescence initiale au bout d'un an.

3.3.6. Variante dans le traitement des lames d'immunofluorescence

Nous avons dit (voir page 28) que les lames passaient d'abord dans un bain d'acétone pendant 20 minutes, puis que les calques étaient « colorés » par les globulines A et B et mis à l'étuve à 37° pendant une demi-heure, enfin lavées avec une solution tamponnée à pH 7,2, puis dans l'eau distillée.

Diverses variantes ont été proposées et sont en usage dans les quelques laboratoires français spécialisés. Nous signalons la variante indiquée par LARGHI et JIMENEZ (1971) et reprise par FISCHER (1972). Sans passage à l'acétone les calques sont recouverts de conjugué. Le contact entre les calques et les globulines A et B est maintenu 10 minutes seulement et à la température du laboratoire au lieu de celle de l'étuve à 37°. Puis les lames sont lavées avec la solution tampon et de l'eau ; on les laisse sécher pendant 10 minutes et on fixe les lamelles à l'Elvanol. Selon FISCHER le temps nécessaire à la préparation, entre le moment de la réalisation du calque et la lecture de la lame passe de 2 heures 15 minutes, à 1 heure 9 minutes, soit évidemment un gain de temps d'environ moitié, ce qui est appréciable, d'autant qu'il s'agit entre ses mains d'examen d'animaux mordeurs pour lesquels la rapidité du diagnostic est absolument primordiale. Cependant le même auteur ajoute que « les images données par la réaction antigène-anticorps fluorescents sont plus pâles ; les éléments arrondis ont un liseré d'un vert très pâle ». Il signale qu'on rencontre moins d'artefacts mais admet que les « images de positivité sont plus pâles » et il conclut que « pour avoir des images plus nettes, on peut prolonger le temps de contact des dé-

calques avec la globuline + suspensions : 25 minutes au lieu de 10 minutes ». Une partie de l'avantage annoncé dans la réduction du temps se trouve donc annulée.

Pour en revenir au passage dans l'acétone, LARGHI et JIMENEZ (1971) sont d'avis que « l'acétone altère d'une certaine manière l'antigène rabique », ce qui n'est pas impossible ; mais nous faisons remarquer que la technique originale de GOLDWASSER et KISSLING (1958) qui comportait un bain de 4 heures dans l'acétone a déjà été modifiée depuis longtemps, le temps étant ramené à 20 minutes, et que ce temps est employé par la plupart des laboratoires dont le nôtre.

En ce qui concerne le lavage opéré après la réaction à l'étuve, rappelons qu'il a pour but d'enlever les globulines fluorescentes qui ne seraient pas fixées spécifiquement sur l'antigène rabique. Nous utilisons l'eau du robinet (pH 7,6), en eau courante, pendant 15 à 20 minutes ; aucune différence ne semble due à cette modification de la technique.

Quant au délai de réaction entre l'antigène et l'anticorps et quant à la température qui favorise cette réaction, on ne possède pas de données très sûres. LARGHI et JIMENEZ, faute de renseignements sur la cinétique du phénomène, se basent sur les travaux de MEYER et HEIDELBERGER (1942) réalisés sur la vitesse de combinaison de l'anticorps spécifique avec les polysaccharides du pneumocoque ; d'après eux, les 95 % de la réaction sont effectués en 3 secondes et ensuite la vitesse décroît progressivement. Rien ne vient cependant indiquer qu'il en est de même dans la réaction antigène-anticorps rabiques.

Nous avons essayé de modifier le temps d'étuve ; voici ce que nous avons observé. En dessous de 16 minutes (4, 8, 12 minutes), la fluorescence spécifique était extrêmement pâle, pratiquement invisible ; au-delà de 16 minutes et jusqu'à 32 minutes, la fluorescence devenait « normale ». Cependant on ne notait pas d'amélioration à mesure que le temps augmentait entre ces deux extrêmes.

Compte tenu de tout ceci, nous avons maintenu le bain d'acétone de 20 minutes et l'incubation de la réaction spécifique dans l'étuve à 37° pendant 30 minutes au moins. Nous ne voyons pas d'ailleurs ce qu'on peut gagner à abréger les manipulations de 60 minutes... même en cas de diagnostic en vue d'un traitement. Le succès de celui-ci ne dépend tout de même pas d'une heure en plus ou en moins et l'incertitude à laquelle peut faire aboutir une fluorescence très pâle peut être au contraire une source d'hésitations et de retards additionnels.

3.4. La coloration de Sellers

C'est la technique qui est capable, si on le désire, de donner son résultat en priorité, puisqu'il suffit de plonger quelques minutes

les calques frais et sans autre préparation, dans le bain colorant et de les monter sous lamelle pour les lire. La lecture peut donc être faite un quart d'heure environ après la réception de prélèvement. Malheureusement le degré de fiabilité de la méthode est faible, notamment en cas de négativité. La coloration de Sellers met en évidence les corps de Negri.

3.4.1. Matériel nécessaire

Le colorant de Sellers se prépare à partir de deux solutions mères*.

La solution A est faite de :

- Bleu de Méthylène (R.A.L. ou Colour Index 52015 ou Index Schultz 1038) 10 g
- Méthanol pur (rigoureusement exempt d'acétone) pour analyse 1000 ml

La solution B contient :

- Fuchsine basique (R.A.L. ou Colour Index 42510 ou Index Schultz 780) 10 g
- Méthanol pur pour analyse (rigoureusement exempt d'acétone) 1000 ml

Ces solutions mères sont à garder en flacon bien fermé et à l'abri de la lumière. En pratique nos flacons de réserve sont en chambre froide ; de la sorte ils peuvent être préparés en grande quantité à l'avance ; comme la plupart des colorants, ceux-ci s'améliorent en vieillissant.

Le mélange de Sellers s'opère de la façon suivante :

- Solution mère A (bleu de Méthylène) : 2 parties.
- Solution mère B (Fuchsine) : 1 partie.

Le mélange n'a pas à être filtré. On l'utilise dans des bacs à coloration avec panier porte-lame. Les bacs sont remis au réfrigérateur tout de suite après usage.

* SHIMADA (1971) préconise les solutions de SELLERS modifiées comme suit :

Solution A : Bleu de méthylène 1,5 g pour 100 g de méthanol ;

Solution B : Fuschine basique 6 g pour 100 g de méthanol ;

on mélange 0,5 ml de la solution A ; 0,55 ml de la solution B ; 100 ml de glycérine diluée à 50 pour 100 dans de l'eau distillée.

L'auteur japonais indique, avant le bain colorant des calques : *un séchage à l'air*, un bain de 1 à 2 minutes soit dans le méthanol, soit dans l'éther. Il recommande un temps de coloration de 5 à 6 minutes et la mise sous lamelle sans lavage du colorant ; il exprime le surplus par pression entre des papiers filtres, ce qui entraîne, dit-il, « la dispersion des granulations renfermées par les cellules nerveuses ».

La formule du mélange peut être modifiée selon les besoins en augmentant le bleu, si les calques prennent trop le rouge, ou inversement. Nous n'avons jamais eu à procéder à ce réglage, la formule classique nous ayant toujours donné satisfaction.

3.4.2. Réalisation

Nous avons vu au paragraphe 3.2. la préparation des lames destinées au Sellers par confection d'un calque à partir d'une section transversale de la corne d'Ammon. Précisons que là encore ces empreintes doivent être faites d'une main très légère de façon à éviter le dépôt d'une grande quantité de matériel nerveux sur le verre ; lorsque le prélèvement qui arrive n'est pas en état de fraîcheur la matière cérébrale devient visqueuse sous l'effet de l'autolyse ou de la putréfaction commençante ; la quantité qui adhère à la lame est trop importante, en conséquence la fixation des colorants sera massive et la lame particulièrement illisible.

Le calque léger sera répété 4 ou 5 fois selon sa taille sur la longueur utile de la lame.

Il est de la plus haute importance que les calques destinés à la coloration de Sellers soient plongés **immédiatement** dans le bain colorant avant que la substance déposée sur le verre ait eu le temps de sécher à l'air. En pratique le délai doit être nul, surtout si l'on travaille dans un box chauffé ou ventilé. Faute de cette célérité dans l'exécution, le film de substance nerveuse se dessèche, se rétracte et présente après le bain colorant, sous le microscope, un aspect en mosaïque qui rend la préparation absolument inutilisable.

La durée de la coloration est classiquement indiquée en secondes (1 à 5 secondes selon l'épaisseur du frottis). Nous nous sommes aperçus que la durée de cette coloration avait peu d'importance. Actuellement voici comment nous procédons :

Les lames sont immergées immédiatement après la réalisation des calques pendant tout le reste des opérations de prélèvements de la série en cours. Cela signifie que, selon le nombre de prélèvements à exploiter, les lames vont séjourner de 3 à 20 minutes dans le colorant. La seule précaution à prendre mais elle est d'importance, est de limiter le temps de coloration des lames provenant de prélèvements en voie d'autolyse car, nous l'avons vu, ils sont épais et prennent intensément le colorant sous forme de taches opaques qui compromettent radicalement leur lisibilité.

Une fois la coloration faite, les lames sont lavées sous l'eau du robinet et on les laisse sécher verticalement sur des plaques de Vigier.

Elles sont ensuite montées à l'Entellan (Merck), solution d'une résine synthétique dans le toluène qui se solidifie à température normale en 20 minutes.

3.4.3. Lecture

Il est recommandé d'étudier d'abord les calques à faible grossissement, de manière à reconnaître quels sont les endroits qui seront les plus intéressants à examiner en détail à un plus fort grossissement, voire à l'immersion.

En réalité, voici comment nous procédons. Il est relativement facile de prévoir en quels endroits de la lame, il pourra être possible de faire une lecture. C'est toujours à la périphérie de chacun des calques que se trouvent les zones à faible densité de cellules nerveuses. Dans ces zones, sur un fond légèrement rose, on distingue les noyaux des grands neurones en bleu violet clair, marqués d'un nucléole plus sombre. Les corps de Negri sont rouges, leur couleur va du rouge « vin de Bordeaux rouge » ou lie-de-vin à un rouge un peu plus brillant *. Ils se situent immédiatement au voisinage des noyaux cellulaires, parfois il en est qui semblent indépendants de toute cellule.

Ils sont toujours ronds ou ovalaires parfaits, leur circonférence ne présente jamais d'angulation.

A un grossissement plus fort on peut voir une structure interne formée de granulations plus foncées. De toute façon, contrairement à ce qui se passe sur les coupes, il ne sont pas réfringents, ils paraissent « plats ». Au grossissement $\times 320$ que nous utilisons, on ne distingue pas leur structure interne, c'est la raison pour laquelle nous nous réservons de décrire celle-ci à propos des examens histologiques. Nous envisagerons la nature des corps de Negri en page 40.

La lecture des lames colorées par la technique de Sellers est l'une des plus délicates à apprendre, c'est une question de tour de main. Mais une fois qu'on domine cette technique, on en retire bien des satisfactions.

Précisons que pour un bon entraînement, il convient de faire en premier la lecture des Sellers, pour pouvoir la corriger éventuellement par la lecture de l'immunofluorescence. En procédant à l'inverse on ne progresse pratiquement pas dans la lecture des Sellers.

* Les classiques décrivent les corps de Negri mis en évidence par la coloration de Sellers, comme étant de couleur magenta (ou héliotrope). Nous ne pensons pas, pour l'avoir éprouvé nous-même, que cette notation soit d'un grand secours au débutant. C'est pourquoi nous préférons indiquer la couleur lie-de-vin ou vin de Bordeaux rouge.

3.5. L'histopathologie

Nous nous sommes quelque peu étendu sur le matériel nécessaire et sur la réalisation des techniques d'immunofluorescence et de la coloration de Sellers ; nous ferons de même tout à l'heure avec l'inoculation aux souris, parce que ces techniques, par certains aspects, sont spéciales au diagnostic de la rage ou parce qu'elles présentent ici des particularités notables. Il n'en est pas de même avec l'histopathologie qui ne diffère que très peu, en matière de rage, de ce qu'elle est en général.

Le diagnostic histopathologique de la rage consiste ainsi que l'a rappelé LEPINE (1967) « à reconnaître chez l'animal, l'existence d'une encéphalomyélite aiguë et à en rapporter la cause à son agent spécifique, le virus rabique ».

Il est donc évident que le diagnostic formel de rage ne peut être posé qu'au vu des lésions spécifiques en l'occurrence les corps de Negri. On les considère actuellement comme des lésions cellulaires consécutives à la présence du virus.

En cas d'absence de ceux-ci (ce qui peut se produire si la durée de l'évolution de la maladie a été abrégée par abattage ou euthanasie), il est intéressant de rechercher, pour les noter sur la feuille de diagnostic, les lésions d'encéphalite. Ce sont principalement les manchons périvasculaires, l'infiltration du parenchyme avec formation de nodules de Babes. On confirme ainsi l'existence d'une encéphalomyélite aiguë qui vient corroborer la positivité de l'une ou l'autre des techniques concomitantes.

Nous avons même posé en principe qu'il nous fallait voir au moins deux corps de Negri indiscutables pour poser le diagnostic positif.

3.5.1. Le matériel nécessaire.

Nous ne rapporterons ici que ce qui modifie les techniques habituelles de l'histologie.

3.5.1.1. La préparation du colorant

Parmi toutes les méthodes de coloration des corps de Negri, nous avons choisi la coloration à l'hémalum éosine-safran, que nous nous avons simplifiée en supprimant le safran, puisque nous ne traitons que de la substance nerveuse et que celle-ci ne contient pas de tissu conjonctif destiné à être coloré électivement par le safran. La coloration de Mann donne également d'excellents résultats, mais elle est plus longue à réaliser.

De la préparation de l'hémalun nous ne dirons rien, non plus que de celle de l'éosine ou de l'érythrosine, nous signalerons simplement que le mélange de ces deux colorants rouges doit se faire selon les proportions ci-après :

- Eosine à 1 %, 2 parties ;
- Erythrosine à 1 %, 1 partie ;

alors que dans la technique normale, en dehors de la recherche des corps de Negri, on fait ce mélange à parties égales.

En dehors de cela, le colorant n'a rien de spécifique.

3.5.2. Réalisation

Quelques détails techniques sont à noter. Nous reprenons en fin d'après-midi les fragments de corne d'Ammon déposés dans le liquide de Bouin le matin même. A ce moment ils sont déjà suffisamment raffermis en surface pour que le bistouri puisse découper les rondelles de 3 à 4 mm d'épaisseur environ qui conviendront à la mise en paraffine. Ces prélèvements sont alors placés dans les capsules métalliques perforées dans lesquelles ils feront le circuit d'inclusion en paraffine. Pour le reste de la journée et pour la nuit ces capsules sont mises dans un cristalliseur de Bouin avec agitateur magnétique. De la sorte la fixation est accélérée, d'une part par la petitesse des fragments, d'autre part par l'agitation continue. Le lendemain les capsules sont confiées au Technicon-Duo qui se charge de les faire passer successivement dans 2 bains d'alcool à 80°, d'alcool à 95° puis à 100°, enfin dans trois bains de toluène et deux bains de paraffine ; seize heures trente après la mise en route, les prélèvements sont prêts à être coulés dans les blocs.

Le coulage des blocs, la confection des coupes à 3 ou 4 μ , leur déparaffinage, leur passage dans les bacs destinés à la coloration et leur montage sous lamelle au baume du Canada ne nous retiendront pas. Nous dirons seulement que la coloration doit être légère, de couleur apparente rose très pâle.

3.5.3. La lecture

Elle se fait au grossissement 320. On conseille au débutant de commencer ses recherches sur une lame donnée avec un grossissement plus faible ($\times 120$ par exemple), il aura plus de facilité à repérer les couches de cellules pyramidales de la corne d'Ammon et la couche moyenne des neurones ganglionnaires de ce même organe. L'enroulement incomplet, formant engrenement, de ces deux couches est absolument caractéristique. Avec l'habitude on parvient directement, si le prélèvement est correct, au grossissement $\times 320$ à l'endroit souhaité.

Les corps de Negri sont des formations rondes ou ovalaires dont la taille est très variable ; elle varie entre 0,25 et 30 μ . Ils se situent dans le cytoplasme des cellules nerveuses en un point quelconque de celui-ci. Parfois ces corpuscules ont l'air d'être en dehors de toute cellule, ceci provient évidemment d'un artefact dû à la coupe.

Sur un stroma rose, les noyaux sont de couleur violet clair, avec des nucléoles plus foncés, de même couleur que les leucocytes. La chromatine des noyaux apparaît sous forme d'un réseau violet foncé. Les corps de Negri sont rouges, mais ce n'est pas tellement par leur couleur qu'ils se distinguent du reste de la préparation, mais par leur structure. Ils sont réfringents et lorsqu'on manœuvre à petits coups la vis micrométrique, on les voit sur divers plans, alors que le cytoplasme cellulaire disparaît ; de la sorte on a nettement la sensation qu'ils sont de véritables corps étrangers dans la cellule.

Enfin les gros corps de Negri possèdent parfois, mais ce n'est pas la règle, une structure interne formée de condensations basophiles qui est absolument caractéristique.

Les corps de Negri ont été décrits comme ayant l'apparence d'un roulement à billes, ce qui signifie qu'autour d'un cercle central, on trouve plusieurs cercles plus petits en couronne, qui représentent les billes du roulement. Ces structures internes n'ont pas de coloration particulière avec l'hémalum-éosine ; c'est, encore une fois, surtout la réfringence qui les laisse distinguer.

Il n'est pas nécessaire que tous les corps de Negri présentent des structures internes. Seuls quelques-uns sur une préparation vont être typiques. Les autres se présentent comme des corpuscules rouges d'une réfringence différente de celle du cytoplasme.

En vérité toutes les descriptions qui peuvent être faites dans les traités et les manuels ne valent pas une bonne démonstration ; on s'en aperçoit presque journellement. Quant à la confusion qui pourrait être faite entre les corps de Negri véritables et d'autres inclusions cytoplasmiques, nous pensons qu'elle est impossible si l'on rencontre au moins quelques corps de Negri possédant une structure interne « en roulement à billes ». Il est bien rare que sur l'ensemble des coupes correspondant à un numéro on ne découvre pas au moins un ou deux corps de Negri classiques.

« On s'accorde à reconnaître (TIERKEL, 1967) que le corps de Negri est spécifique de la rage et que sa présence est toujours caractéristique de cette affection. De plus un corps de Negri bien développé ne peut être confondu avec rien d'autre ».

3.5.4. Nature des corps de Negri dans la rage des rues

Lorsqu'on essaye de comprendre ce qu'est exactement le corps de Negri, on se trouve en face d'opinions divergentes.

Pour les uns, les corps de Negri sont de véritables cicatrices témoignant d'une authentique guérison de la cellule malade. Ainsi que l'a nettement dit THIERY (1959) : « Le corps de Negri traduit la défense de la cellule ; la cellule pyramidale qui renferme des corps de Negri possède habituellement tous les critères d'une cellule bien vivante ». Ceci rejoint en somme les conclusions déjà anciennes de LEVADITI (1928) qui notait une certaine corrélation entre l'intensité des lésions histopathologiques et le degré de disparition du virus, ce qui pouvait aboutir, en terme ultime, à l'autostérilisation d'une infection pourtant mortelle.

Pour les autres (MIYAMOTO et MATSUMOTO, 1965), l'examen en microscopie électronique permettrait de dire que, dans les neurones infectés par le virus rabique, les corps de Negri sont des foyers de multiplication du virus.

Nous avons le sentiment de pouvoir intervenir dans le débat et peut-être de façon positive. Notre expérience journalière du diagnostic de la rage, qui nous fait passer sans transition de l'oculaire du microscope à fluorescence, à celui du microscope d'histologie (pour l'examen de calques colorés par la méthode de Sellers ou celui de coupes colorées par l'hémalum-éosine) — les uns et les autres examens étant d'ailleurs, et c'est important, effectués au même grossissement — nous a permis de faire certains rapprochements instructifs.

Nous nous sommes rendu compte qu'il fallait tout d'abord être bien certain que ce dont parlent les anatomo-pathologistes d'une part et les chercheurs japonais d'autre part, est bien identique.

Il faut, selon nous, bien distinguer :

1° Le corps de Negri au sens classique, formation anatomique absolument typique, mise en évidence par les méthodes histopathologiques.

2° Le corpuscule fluorescent spécifique, rendu visible par une réaction spécifique antigène-anticorps.

3° L'amas de virions rabiques, vu en microscopie électronique et, éventuellement, lorsque sa taille est suffisante, après coloration fluorescente spécifique.

4° Les virions isolés, seulement perceptibles au microscope électronique parce que leur taille est trop faible pour qu'ils soient aperçus après réaction antigène-anticorps spécifique.

Lorsqu'on procède aux divers examens correspondant à un prélèvement donné, on peut se trouver en face de la situation suivante. Il arrive que l'on découvre un nombre très élevé de corps fluorescents spécifiques de forme ronde ou ovale, dont certains sont d'une taille tout à fait comparable à celle des corps de Negri stricto sensu.

A-t-on pour autant le droit de dire, ainsi que certains l'ont fait, que l'on se trouve en présence de corps de Negri ?

Pour notre part, nous ne le pensons pas et voici quels sont nos arguments. Les lames correspondant au même cas (provenant, nous le rappelons parce que c'est important, de la même section de corne d'Ammon qui sert à faire tous les calques) colorées à la solution de Sellers sont lues immédiatement avant ou après * les lames d'immunofluorescence ; on découvre un nombre beaucoup moins important de corps de Negri et d'une taille en tous cas plus réduite. Il en est de même quarante-huit heures après lorsqu'on prend connaissance des lames d'histologie qui sont des coupes de la même corne d'Ammon colorées à l'hémalun-éosine. Cette fois les corps de Negri sont, dans l'ensemble des cas, plus rares encore que sur les lames colorées au Sellers ; au surplus on ne rencontre en aucun cas de corps de Negri stricto sensu aussi gros que certains des corpuscules fluorescents spécifiques les plus volumineux.

Nous interprétons déjà cette différence de nombre et de taille en nous rappelant que, dans le premier cas (examen en fluorescence spécifique), nous avons rendu visibles des amas d'antigène rabique, que le virus ait eu ou non le temps de provoquer une réaction de défense cellulaire, tandis que dans le second cas (coloration de Sellers sur calque ou hémalun-éosine sur coupes), ce que nous voyons ce sont des réactions de défense cytoplasmiques qui supposent une lutte préalable entre les virions et les cellules où ils sont entrés en replication.

De cette lutte, nous avons depuis quelques années une idée un peu plus précise. WIKTOR (1966 a et b) (1972, communication personnelle), ainsi que KAPLAN, WIKTOR et leurs collaborateurs (1967) qui ont parfaitement étudié le devenir du virus lorsqu'il est inoculé à des cellules, non plus appartenant à un être vivant, mais des cellules en culture de tissus, ont montré grâce à la fluorescence spécifique, non seulement que le nombre des cellules infectées augmentait avec le temps compté en heures, à partir de l'inoculation, mais aussi que le nombre et l'importance des formations fluorescentes au sein des cellules allait en croissant jusqu'à un maximum pour dé-

* L'examen des calques colorés par le Sellers est pratiqué par nous généralement avant celui des lames de fluorescence ; mais souvent nous le renouvelons après, de manière à comparer plus étroitement.

croître ensuite ; alors les formations fluorescentes se fragmentent, la fluorescence diminue et la cellule redevient négative, elle se débarrasse de l'infection ; un premier cycle est ainsi terminé. Ces auteurs ont également montré que la phase du cycle où la fluorescence était la plus importante était précisément le moment où l'on pouvait mettre en évidence le moins de virus et que ce virus avait le moins d'infectivité (infectivité mesurée *in vitro* sur cultures cellulaires par le comptage des plages). Par conséquent lorsque la fluorescence est la plus marquée, la cellule est en voie de guérison. Cette donnée moderne est en parfait accord avec l' « autostérilisation des infections virales pourtant mortelles » de LEVADITI. Bien entendu, la culture de tissu ne se comporte pas ensuite comme un animal vivant atteint de rage ; chez elle un second cycle de replication virale débute immédiatement à partir des quelques cellules qui sont restées infectées ; tandis que chez l'animal c'est la mort qui, en général, se produit à ce stade précis.

WIKTOR (1971) est formel ; il assimile le système « culture de tissu » à un organisme vivant, le considérant comme un véritable modèle expérimental : « Le cytoplasme des cellules infectées de rage en culture de tissu contient des inclusions qui peuvent être mises en évidence par différents procédés mettant en œuvre des colorants conjugués aux protéines. Ces inclusions correspondent aux corps de Negri que l'on trouve dans les cellules nerveuses des animaux infectés par le virus rabique des rues ». Il rappelle d'ailleurs que les études cytochimiques comparatives montrent que les protéines de la matrice des inclusions provoquées par l'infection due au virus rabique *in vivo* sont de même nature biochimique que les inclusions *in vitro*.

De leur côté, LEPINE et CROISSANT (1951) ont mis au point la possibilité d'établir une corrélation entre les images de la microscopie électronique en s'ingéniant à faire « porter l'examen sur les mêmes cellules ou groupes de cellules dans des champs exactement repérés sur des coupes consécutives d'un même bloc ». Leur conclusion est la suivante : « **Le corps de Negri lui-même apparaît ainsi, moins comme l'agglomération de particules virulentes que comme une coagulation du plasma cellulaire autour d'un ou de plusieurs corps élémentaires virulents, ou encore comme l'agglomération et l'enrobage du virus masqué par les anticorps cellulaires** *. En d'autres termes, quelle que soit l'explication donnée des images électroniques, les corps de Negri ne paraissent pas résulter seulement de la présence et de la multiplication du virus dans la cellule, mais semblent comporter une participation cellulaire importante à titre de réaction (de dégénérescence ou de défense) autour du virus ».

* C'est nous qui soulignons.

Pour avancer si possible dans l'interprétation des faits observés de toute part, nous avons eu, nous aussi, l'idée de comparer étroitement (c'est-à-dire champ par champ, structure par structure) ce que l'immunofluorescence d'une part et ce que les colorations histologiques d'autre part, permettent de découvrir dans les cas positifs de rage sauvage.

Nous avons d'abord tenté de réaliser une immunofluorescence spécifique sur des coupes d'histologie ; nous avions pour idée directrice de chercher à comparer deux coupes contiguës, donc comparables, d'une même corne d'Ammon, l'une colorée par la méthode histopathologique, l'autre par la fluorescence spécifique. Ne disposant pas de microtome à congélation qui aurait apporté la solution à notre problème technique, nous avons essayé sur des coupes obtenues après inclusion à la paraffine. Une fois déparaffinées, ces coupes étaient mises en contact à l'étuve avec le conjugué antirabique ; malheureusement le traitement subi par le tissu, contact avec le formol (présent dans le liquide fixateur de Bouin), avec le toluène et avec l'alcool, dénaturait l'antigène rabique et n'autorisait plus la réaction spécifique ; on n'observait alors que la fluorescence propre du tissu cérébral.

Dans une seconde série d'essais, conseillé en cela par GUILLON (1972), nous nous sommes adressé à des calques préparés comme nous l'avons décrit. Ces calques sont d'abord colorés au conjugué antirabique selon la méthode classique, en évitant cependant le passage par l'acétone ; ensuite au lieu de les monter entre lame et lamelle avec l'Elvanol, on les monte provisoirement à la glycérine de façon à pouvoir commodément ensuite retirer la lamelle. Lors de l'examen en immunofluorescence on repère un champ intéressant, comprenant par exemple un nombre limité de corpuscules de tailles diverses, assemblés de façon caractéristique ou disposés dans une même cellule. On dessine sur un papier ce qu'on voit afin d'en fixer l'image. La lame est alors privée de sa lamelle et la glycérine lavée à l'eau courante. Cette lame séchée on la plonge pour 15 minutes dans le colorant de Sellers (il faut ne pas craindre d'allonger le temps de cette coloration car il y a peu de substance cérébrale sur le verre) ; on la monte à l'Elvanol et on la présente à nouveau au même microscope dont, entre temps, la platine n'a pas été déplacée. On retrouve de la sorte inmanquablement le même champ et il suffit de chercher si à chacun des corpuscules remarqués au premier examen, correspond cette fois un corps de Negri au sens classique.

Voici à cet égard les constatations que nous avons faites :

1° Il est impossible de retrouver sous forme de corps de Negri, tous les corpuscules spécifiques, même de taille moyenne ; la proportion de ceux que l'on identifie aux mêmes endroits varie selon les cas de 1 sur 3 à 4 sur 5.

2° Il est impossible de retrouver des corps de Negri ayant la taille des plus gros corpuscules ; il y a bien une corrélation dans leurs dimensions, mais toujours avec une perte.

3° Les plus petits corpuscules, ceux qui sont ponctiformes ne se retrouvent pas sous forme de corps de Negri.

4° Il arrive que la configuration d'un corps de Negri pourtant identifié à l'emplacement exact d'un corpuscule spécifique, soit différente de celle de ce corpuscule. Lors du premier examen le corpuscule est par exemple en forme d'ovale très allongé, alors qu'au second il est circulaire. S'agit-il dans ce cas précis d'un artefact, nous ne le savons pas ?

Il n'est en tous cas pas possible, selon nous, d'assimiler sans nuance le corpuscule fluorescent spécifique au corps de Negri.

Certains corpuscules correspondent réellement à des corps de Negri, mais pas tous. Ce qui reviendrait à dire que les corps de Negri ne sont pas obligatoirement des foyers de replication virale ; certains peuvent effectivement être le siège d'une multiplication intense, tandis que d'autres (vraisemblablement les plus gros et les mieux structurés) sont en réalité des cicatrices de l'infection rabique d'où le virus peut, à la limite, se trouver même absent.

3.6. L'inoculation aux souris

C'est la technique qui a eu longtemps la meilleure des réputations. Il est certain que, du point de vue théorique, c'est la technique la plus fidèle. La souris albinos s'est révélée être un excellent réactif biologique par sa sensibilité régulière quelle que soit la souche et par son prix de revient modique. Son âge n'importe que très peu, tout au plus a-t-on noté que le souriceau de quelques jours est plus sensible, aussi le réserve-t-on aux cas où on peut légitimement suspecter que l'isolement sera difficile, par manque de virulence ou par suite d'une faible concentration virale.

Il ne faut pas cependant croire que l'inoculation donne un résultat fiable à 100 pour 100. Nous verrons, lorsque nous donnerons nos chiffres et que nous les comparerons avec ceux d'autres Centres de diagnostic (chapitre 5.) que la fiabilité de l'inoculation dans le diagnostic de la rage oscille entre 93,3 et 99,4 pour 100.

Les causes des échecs, ainsi que nous appelons les cas négatifs d'après les inoculations où le diagnostic est indubitablement positif par ailleurs, tiennent à plusieurs ordres de faits : le prélèvement peut être en état de putréfaction ce qui oblige, comme nous le dirons, à faire des dilutions supérieures, le virus peut avoir perdu sa virulence à la suite d'une « neuro-infection auto-stérilisante » de LEVADITI (1928) * ; le virus peut avoir été inactivé par suite d'une erreur de technique telles celles que nous signalerons à propos de la préparation de l'inoculum.

Enfin le virus peut avoir été détruit dans l'échantillon soumis à analyser par suite d'une élévation de la température ambiante comme l'ont montré THIERY (1957) ainsi que BARBESIER et RAMPON (1962) sur le continent africain ; ces derniers en arrivent à conclure que dans la moitié des cas où il y a discordance entre une inoculation négative et les autres examens positifs, cela provient de l'action de la chaleur agissant avant l'arrivée au laboratoire. On sait parfaitement par ailleurs que les examens en immunofluorescence, la coloration de Sellers et l'histopathologie ne nécessitent aucunement que le virus soit vivant et virulent pour donner des images de positivité.

3.6.1. L'animalerie et les animaux

L'animalerie est installée dans une pièce spéciale, pourvue d'une climatisation poussée ; ce dispositif lui assure une température constante de 22°, une hygrométrie relative entre 40 et 50 % et un renouvellement permanent de l'air.

3.6.1.1. Les cages

Les souris sont placées par groupes de 5 dans des cages (STIGMA) formées d'une boîte en matière plastique (polystyrène cristal) rigide et transparente de dimensions intérieures suffisantes pour 5 sujets (L : 24 cm, l : 10,5 cm et H : 8 cm) qui est munie d'un couvercle en fil galvanisé formant d'un côté mangeoire, de l'autre support incliné pour le biberon. La distance entre les barreaux est de 6 mm. Elles sont placées sur des portoirs en cornière d'acier disposés en traverses longitudinales dans l'animalerie. Les biberons sont en polypropylène ; ils ont 250 ml et sont munis d'une tétine conique en acier inoxydable percée d'un trou minuscule par où s'écoule une goutte d'eau. Les biberons sont remplis chaque 7 jours. Ils sont désinfectés après chaque série de souris, soit à l'autoclave, soit à l'eau de Javel.

Ces boîtes sont à jeter après usage ; elles possèdent divers avantages : transparence totale permettant un contrôle visuel plus rapide des animaux, stockage facile (un carton de 70 × 50 × 40 cm, en renferme 200 unités) et inutilité de la stérilisation. Les boîtes sont détruites par le feu, une fois atteinte la fin de la période d'observation.

* Un taux suffisant de substance inhibitrice spécifique peut exister dans la substance cérébrale de l'animal mort de rage. Selon WILSNACK et PARKER (1966), cette substance inhibitrice est spécifiquement antirabique ; elle est thermostable à 56° pendant 30 minutes ; elle ne sédimente pas par la centrifugation ordinaire ; sa présence dans les tissus ne semble pas influencer sur le résultat de l'immunofluorescence. Enfin comme l'a montré SIKES (1962), certains animaux fabriquent des anticorps séroneutralisants peu de temps avant leur mort.

La litière est formée d'une grosse poignée de copeaux de bois qui est changée chaque 7 jours.

3.6.1.2. L'alimentation

L'aliment provient d'un fournisseur spécialisé ; il est présenté sous la forme de cylindres de 15 à 35 mm de long sur un diamètre de 18 mm, pesant entre 6 et 15 gr. On doit compter que les souris adultes en absorbent environ 5 g par jour et par tête.

La composition est la suivante :

Farine de céréale biscuitée, tourteau de soja et d'arachide, farine de poisson, sucre, supplément minéral vitaminé.

La composition du supplément vitaminé pour 100 K est égale à :

Vitamine A 1.500.000 UI., D³ 450.000 UI., B1 1.500 mg, B2 650 mg, B6 400 mg, B12 2,5 mg, PP 6.000 mg, Pantothénate de calcium 2.000 mg, Acide Folique 100 mg, Mésoinositol 100 mg, E 3.500 mg, K 300 mg, Choline 100.000 mg, Acide para-amino-benzoïque 50 mg.

Il est ajouté du Santoquin * à la dose de 12,5 g pour 100 K.

La teneur en vitamines est garantie durant 4 mois en sacs d'origine.

La garantie d'ensemble est ainsi indiquée :

Teneur minimum : matières protéiques brutes 20 % ; matières grasses 2 %.

Teneur maximum : humidité 14 % ; matières cellulosiques 4,5 % ; matières minérales 7 %.

3.6.1.3. Les souris

Les souris sont achetées à un fournisseur spécialisé qui nous adresse des sujets adultes, de sexe et de poids uniformes (entre 16 et 18 grammes).

On doit laisser reposer les souris qui viennent de voyager, même si le trajet a duré moins de 24 heures et s'est effectué dans des boîtes de transport semi-obscurées, à l'abri des courants d'air et pourvues d'aliment et de boisson. Au cours des premières vingt-quatre heures après leur mise en place à l'animalerie, elles ne mangent ni ne boivent et restent endormies les unes sur les autres, le poil hérissé. Lorsqu'elles sont reposées, elles peuvent être inoculées.

3.6.1.4. Le box d'inoculation

A l'animalerie est annexé un box d'inoculation où peuvent travailler ensemble deux personnes. Il est alimenté en air conditionné, stérilisé par les ultra-violets.

* Le santoquin (1,2 dihydro-6-éthoxy,2,2,4, triméthyl-quinoléine) est un anti-oxydant qui stabilise les vitamines A, D et E, lesquelles sont, on le sait, très facilement détruites par l'oxydation ; par ailleurs le santoquin empêche le rancissement des graisses.

3.6.2. Réalisation de l'inoculation

3.6.2.1. Préparation de l'inoculum

Dans le diagnostic de routine on recherche la présence de virus dans la corne d'Ammon exclusivement. C'est seulement en cas d'absence de cette portion de l'encéphale, pour les mêmes raisons que celles que nous avons vues à propos de l'histologie, que l'on s'adresse par ordre de préférence au bulbe, au cervelet, voire au cortex où à la moelle épinière cervicale.

Il s'agit de faire une dilution au dixième, c'est-à-dire que pour 10 parties d'inoculum, ou aura une partie de matière cérébrale et 9 parties de diluant. En pratique, nous avons fixé à 1/2 ml le volume de substance nerveuse et à 4,5 ml le volume du diluant.

Le fragment de tissu nerveux central est soigneusement broyé de manière non seulement à permettre la mise en suspension de la substance, mais encore à libérer les particules virales éventuelles des cellules qui les contiennent.

Nous avons essayé divers types de broyeurs en particulier les broyeurs de POTER. Ces appareils d'un prix de revient élevé sont très fragiles malgré la qualité de leur finition ; il est arrivé qu'ils se brisent dans la main de l'opératrice, ce qui est spécialement dangereux du fait de la virulence possible de leur contenu.

Nous en sommes revenus au mortier et pilon classiques en pyrex, de contenance 60 ml. Ces appareils sont d'un faible prix : on peut en acquérir un nombre suffisant pour un roulement efficace entre le box d'autopsie et le four Pasteur où ils sont stérilisés. La substance nerveuse se laisse broyer avec une grande aisance sans adjonction d'aucun abrasif. Certes, ce matériel ne peut pas être utilisé, ainsi que l'a noté KOPROWSKI (1967) dans des conditions de stérilité aussi poussées que le broyeur de POTER ou celui de TENBROECK ; il ne peut non plus servir à broyer d'autres tissus, les glandes salivaires par exemple. Par contre il a l'incontestable avantage de n'être pas susceptible (comme certains broyeurs à moteur, trop rapides et mal fermés) de créer des aérosols dangereux parce que contenant en suspension des particules virulentes.

Nous effectuons un broyage poussé jusqu'à ce que le demi-millilitre de substance cérébrale soit transformé en un enduit qui tapisse le fond et les parois du mortier.

Nous pensons qu'il importe de ne broyer qu'au moment de la mise en suspension, car certains échecs de l'inoculation ont pu être attribués au fait que le virus avait pu se trouver inactivé par la dessiccation du tissu nerveux. On sait en effet, et des expériences que nous avons réalisées ici l'ont confirmé, que le virus contenu dans une suspension de tissu nerveux en couche mince est inactivé dans un délai très court de l'ordre de 30 minutes ; pratiquement, lorsque le dépôt de substance virulente est desséché, le virus n'a plus d'activité.

Dès lors, on comprend que lorsqu'une série de prélèvements est en cours d'exploitation (série qui peut comporter selon le rythme des entrées de 7 à 20 numéros différents), il importe de se contenter de déposer dans chacun des mortiers correspondants la quantité de substance cérébrale voulue et de n'effectuer le broyage qu'au moment où on est prêt à ajouter le diluant ; sinon les minutes qui passeraient permettraient, pour les premiers numéros, une action de l'air assez prolongée pour que le virus soit détruit en tout ou partie.

Le diluant que nous employons au Centre d'Etudes sur la Rage a la composition suivante pour 1 litre :

Solution de Hanks *	100 ml
Solution d'antibiotiques	5,480 ml
Eau distillée stérile	892 ml

La solution d'antibiotiques quant à elle répond à la formule ci-après :

Pénicilline G	1 million d'U.O.
Streptomycine	1 gramme
Colimycine	1 million d'U.
Eau distillée stérile	Q.S.p. 50 ml

Cette solution est conservée sous forme congelée. Le diluant est entreposé au réfrigérateur. Nous l'utilisons avec l'aide d'une pipette-seringue automatique qui est installée sur un flacon d'un litre et qui est réglée pour donner, d'un coup de piston, la quantité exacte que nous désirons, soit 4,5 ml.

Le diluant est introduit dans le mortier et la mise en suspension est faite avec le pilon. L'inoculum est alors versé dans un tube stérile muni d'un bouchon qui est placé au réfrigérateur.

Au début nous faisons subir à la suspension une centrifugation de 10 minutes à 2.000 tours/minute. Nous nous sommes aperçu qu'on pouvait parfaitement éviter cette opération car la suspension sédimente en quelques heures, laissant un surnageant limpide qui peut parfaitement être inoculé tel quel.

Nous laissons l'inoculum préparé au réfrigérateur à + 4° jusqu'au lendemain. Depuis le mois d'août cependant nous l'utilisons le jour même, dès que la sédimentation du culot s'est produite, il n'y a aucun inconvénient à procéder de la sorte.

Nous croyons en effet que, contrairement à ce qui a pu être dit à cet égard, il n'est aucunement démontré que ce contact de 24 heures entre les substances antibiotiques considérées et les bactéries éventuellement présentes dans l'échantillon, puisse agir en

* La solution de Hanks est préférée à un sérum animal, lequel est plus difficile à se procurer avec la garantie que le sujet n'a jamais été vacciné contre la rage.

quelque façon que ce soit. N'oublions pas que la température de $+ 4^{\circ}$, condition minimale indispensable à la survie du virus, suffit à inhiber la multiplication des bactéries et que les antibiotiques agissent comme bactériostatiques et non comme bactéricides. Il faudrait, si l'on voulait exploiter réellement le pouvoir bactériostatique des antibiotiques, laisser à la température du laboratoire la suspension à inoculer, ce qui est radicalement impossible.

Plus simplement, il faut admettre que les antibiotiques n'agissent qu'une fois l'inoculum mis en place dans le tissu cérébral, en cas de multiplication bactérienne éventuelle.

3.6.2.2. L'inoculation intracérébrale

Les souris sont inoculées de la manière classique par voie intracérébrale ; la dose est de trois centièmes de ml ; chaque dose contient 3 unités Oxford de pénicilline G, 3 unités de colimycine et 0,003 mg de streptomycine.

Il n'est pas indispensable d'anesthésier les souris. Avec un peu d'habitude on les saisit par la queue, de la main gauche et on les dépose en les balançant vers la main droite sur un plateau de bois recouvert d'un grillage en plastique facile à désinfecter ; les griffes des souris s'accrochent aisément sur le grillage, la souris tend à se propulser en avant et sa queue maintenue entre le pouce et l'index gauches l'en empêche, elle est ainsi immobilisée ; on fait alors passer le bout de la queue entre l'extrémité du petit doigt et le bord de la paume en tordant le poignet, puis par mouvement inverse de la main, on agrippe la peau du cou derrière les oreilles entre le pouce et l'index. La main droite tient la seringue de 1/4 de ml graduée en centièmes, munie d'une aiguille de 6/10. Les aiguilles plus fines (4/10) sont souvent bouchées et celles que nous employons n'ont jamais entraîné par elles-mêmes de mortalité. L'aiguille est enfoncée de 2 mm environ à travers la peau et le crâne dans le tissu cérébral, en un point situé entre l'œil gauche et l'oreille droite de la souris. Nous préconisons un lieu d'inoculation situé sur la gauche de la tête parce qu'ainsi la seringue est maintenue très proche de l'horizontale, ce qui permet une lecture aisée des graduations. La main droite portant la seringue ne quitte pas la table ; c'est la gauche qui prend les souris, les présente, en assure la contention et les replace dans une boîte d'attente sans risque d'inoculation accidentelle de l'opérateur.

Les seringues utilisées sont déposées, le piston à part mais l'aiguille en place, dans une bouilloire contenant de l'eau distillée. Elles seront portées à l'ébullition sans autre rinçage ou manipulation, puis elles seront mises à l'autoclave sous emballage traditionnel. On emploie également des seringues à usage unique qui sont détruites.

La feuille d'observation, du modèle classique, est remplie. Le jour 0 est le jour de l'inoculation. La période d'observation de 28 jours commence.

Chaque jour les souris sont examinées. La transparence des boîtes à usage unique facilite cet examen en série, mais chaque boîte doit être prise à la main et ouverte parfois. Sur les feuilles d'observation on note sur la ligne correspondant à chacune des 5 souris si elle est en bon état (γ), malade (M.), paralysée (P.) ou morte ($\dagger$). Malade signifie que la souris a le poil hérissé, qu'elle reste en boule, mais peut encore se déplacer si on la sollicite, cet état dure 24 heures environ. Paralysée veut dire que l'incapacité au déplacement est totale, la queue est tenue droite et raide, parfois le sujet est agité de tremblements. Dans cet état, qui se prolonge de quelques heures à 24 heures, seuls de très courts mouvements respiratoires sont perceptibles et permettent de dire que la souris n'est pas déjà morte. Au total il s'est écoulé en moyenne 48 heures entre l'état normal et la mort.

Lorsqu'après un stade de M, puis P, une souris périt à partir du 5^e jour, son cerveau est prélevé pour examen en immunofluorescence ; de la sorte on est certain de ne rapporter à la rage que les cas authentiques.

Si les 5 souris inoculées meurent les 1^{er}, 2^e, 3^e ou 4^e jour, on admet que la mortalité n'a rien de spécifique, elle est due soit au traumatisme cérébral soit à la septicité ou à la toxicité du cadavre d'où provient le prélèvement. Il convient alors d'opérer une dilution supérieure de l'inoculum. De suspension au dixième on passe à une suspension au centième et on renouvelle les inoculations. On a également préconisé la filtration sur des filtres retenant les bactéries, mais le virus rabique étant parmi les plus gros, il peut très bien se trouver retenu dans le filtre. Par le procédé de dilution, on dilue certes le virus, mais la virulence n'en est pratiquement pas affectée, tandis que la diminution de la concentration en bactéries ou en produit toxiques opérée du même coup permet aux souris de supporter l'inoculation.

Si au centième, l'inoculum entraîne encore la mortalité précoce des souris, il faut diluer davantage de la même manière et passer au millième. A cette dilution les souris survivent, mais dans ces conditions on n'est jamais certain que la négativité constatée au 28^e jour n'est pas due à une pénurie en particules virales. On peut augmenter ses chances dans ce cas en inoculant des souriceaux nouveau-nés.

Lorsqu'au moins une première souris présente une immunofluorescence positive, le cas correspondant peut être considéré comme positif. On continue cependant l'observation des souris survivantes même après le 28^e jour.

3.6.2.2.1. Observation prolongée des souris

Il semble intéressant de savoir pour quelles raisons certaines souris ont des incubations plus longues, ou même ont des incubations infinies, ce qui peut correspondre à un état de résistance naturelle.

Un autre cas se présente également. Tous les examens indiquent sans aucun doute possible l'existence du virus rabique et cependant les 5 souris inoculées sont encore vivantes à la fin de la durée d'observation de 28 jours. Nous conservons les animaux dans le but d'en sacrifier périodiquement* ; d'autre part nous inoculons à nouveau le matériel d'origine à deux boîtes de souris en le diluant cette fois au 1/100 et au 1/1000. Cette dilution n'a plus pour but de lutter contre la contamination bactérienne, elle vise à faire baisser le taux de substances inhibitrices (voir page 45) qui peuvent se trouver dans le tissu cérébral.

Ces études à propos de l'observation prolongée au-delà du 28^e jour feront l'objet de travaux ultérieurs.

3.6.2.3. Nombre des souris inoculées

Comme nous l'avons vu, nous n'inoculons que 5 souris pour chacun des prélèvements à analyser. Les laboratoires qui, comme l'Institut Pasteur ou le Centre Antirabique de Strasbourg, font des diagnostics en vue du traitement de personnes considérées comme éventuellement contaminées, inoculent chaque fois 10 souris. Il leur faut en effet obtenir une réponse aussi rapide que possible et on sait bien que dans certains cas, seule l'inoculation à la souris est capable d'indiquer la positivité.

Dans ces conditions, ils sacrifient une souris à dates échelonnées à partir du 5^e ou du 8^e jour après l'inoculation, de manière à découvrir précocement des images spécifiques de fluorescence alors même que les symptômes ne sont pas encore visibles. De la sorte on peut commencer plus tôt la série d'injections du traitement, donc avec plus de chances de succès.

Pour nous qui faisons exclusivement des diagnostics « vétérinaires » et pour qui la rapidité n'est pas un but en soi, nous pouvons attendre les premiers symptômes pour sacrifier une souris et

* LENNETTE et EMMONS (1971) ont conservé 425 jours des souris qui avaient présenté des signes morbides après inoculation de la rage, mais qui se rétablissaient et survivaient ; leur pouvoir neutralisant apparaissait 18 jours après l'inoculation et à partir de ce moment le virus ne pouvait plus être isolé vivant de leur cerveau. Cependant, l'antigène fluorescent se maintenait dans la corne d'Ammon, le cortex et le cervelet pendant un an, mais il était ensuite éliminé.

pratiquer l'examen en immunofluorescence. En conséquence, 5 souris sont largement suffisantes ; cette réduction entraîne pour le service une économie qui n'est pas à négliger.

3.6.2.4. La durée de l'incubation

Elle est en moyenne d'une douzaine de jours. Nous étudierons plus loin (paragraphe 4.7.) avec quelques détails les observations que nous avons pu faire à cet égard.

3.6.2.5. Essais de raccourcissement de la durée de l'incubation

Nous nous sommes par ailleurs demandé s'il n'était pas possible de raccourcir par un artifice la durée de l'incubation de la rage chez la souris après l'inoculation. L'intérêt d'un tel résultat est évident si on se place dans l'optique d'une analyse dont peut dépendre la précocité d'un traitement.

Les essais encore inédits que nous avons faits ne semblent pas tellement prometteurs. Nous avons essayé deux immunodépresseurs très maniables, et d'un emploi bien codifié, la cyclophosphamide et le méthotrexate. Nous n'avons pas trouvé qu'il existait une différence quelconque dans le délai d'apparition des corpuscules spécifiques en immunofluorescence entre les souris traitées et les témoins non traités, malgré les doses limites de l'immunodépresseur que nous avons préalablement ou simultanément injectées. Tout se passe comme si la durée de l'incubation chez la souris était déjà réduite à sa plus simple expression possible, du fait d'un virus naturellement pathogène pour l'espèce et surtout, croyons-nous, d'une voie d'inoculation particulièrement efficace introduisant le virus directement au contact des cellules où il se multiplie électivement et où il développe ses effets cytopathogènes, les cellules nobles du cerveau. L'installation de l'infection clinique ne peut pas être retardée par le système immunitaire lymphocytaire puisque celui-ci n'est somme toute que très faiblement sollicité, si même il l'est.

D'ailleurs les travaux de MEDAWAR (1948) sur le rejet des greffes de peau homologue en différents endroits de l'organisme (cerveau, tissu conjonctif sous-cutané et chambre antérieure de l'œil) ont montré que l'absence de drainage lymphatique de l'encéphale évite que l'antigène du greffon ne stimule le système lymphatique, lequel formerait des anticorps qui entraîneraient la mort du greffon. C'est bien là le phénomène que nous invoquons pour expliquer l'absence d'effet que nous avons constaté chez les souris inoculées par voie cérébrale par le virus rabique même lorsqu'elles ont été mises en immunodépresseion profonde.

4. RESULTATS OBTENUS AU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE DE NANCY

Nous avons choisi, ainsi que nous l'avons dit, de limiter ce travail à l'étude des 2.000 premiers cas dont nous avons eu à connaître, chiffre qui correspond d'ailleurs à un peu plus d'une année de fonctionnement officiel.

Chacun des prélèvements enregistrés a fait l'objet d'une carte perforée IBM sur laquelle ont été inscrits dans l'ordre :

- 1° la date de réception,
 - 2° le numéro du département,
 - 3° le numéro de la commune, (code INSEE)
 - 4° le numéro d'enregistrement chronologique au laboratoire,
 - 5° le numéro de code de l'espèce (code maison),
 - 6° le résultat de l'examen en immunofluorescence,
 - 7° le résultat de la coloration de Sellers,
 - 8° le résultat de l'histopathologie,
 - 9° le résultat de l'inoculation,
- | |
|----------------------------|
| P = + |
| N = — |
| 0 = absence
de résultat |
- 10° le nombre de jours d'incubation sur souris pour les cas négatifs,
 - 11° le résultat final (P ou N). La mention de ce résultat final n'est faite que pour rendre plus rapide le tri des positifs et des négatifs à la machine.

Cela donne par exemple :

03 10 72 52 104 10 P 0 0 P 12 P

ce qui veut dire que le 3 octobre 1972, nous avons reçu du département de la Haute-Marne, commune de Chancenay, un renard suspect de rage et qu'il a donné un résultat positif en fluorescence, que la coloration de Sellers et l'histopathologie n'ont pu être faites, que les inoculations étaient positives et qu'enfin la durée de l'incubation sur les souris albinos a été de 12 jours.

Une trieuse IBM a réalisé tous les classements que nous avons demandés, tandis qu'une tabulatrice alpha-numérique nous a donné les listes et les totaux que nous souhaitions. Ces travaux ont été effectués avec beaucoup de soin et de diligence par l'Atelier Régional de Mécanographie des Organisations Agricoles annexé à l'Etablissement Départemental d'Elevage de Meurthe-et-Moselle, situé comme le Centre d'Etudes sur la Rage, sur le domaine de Pixérécourt, 54 Malzéville.

4.1. Résultats globaux, toutes espèces réunies

Les résultats globaux sont donnés par le tableau n° 1. On y voit que le nombre des résultats positifs a été de 781 unités, ce qui représente un peu plus de 39 pour 100. Si on compare ce pourcentage avec celui que nous avons calculé pour nos 1.000 premiers prélèvements (inédit, 6 avril 1972), on remarque qu'à cette époque les résultats positifs représentaient 45,9 pour 100. Il est facile de trouver une explication à cette diminution relative des cas positifs ; depuis le 24 février le Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy a reçu mission du diagnostic épidémiologique pour l'ensemble de la France, alors qu'auparavant il ne recevait que des prélèvements venant des départements du Nord-Est. L'aire géographique de compétence du laboratoire ne couvrait que les départements effectivement contaminés à l'époque, d'où une plus grande fréquence des cas de rage, d'autant plus que les populations sensibilisées avaient augmenté leur effort de collecte d'animaux sauvages suspects.

Néanmoins, malgré cette baisse du pourcentage des positifs par rapport au nombre total reçu, nous pouvons remarquer que le nombre de nos positifs reste plus élevé que celui des autres laboratoires spécialisés, à savoir l'Institut Pasteur de Paris avec 8,4 pour 100 (178 positifs sur 2.104) et avec 10,15 pour 100 (272 positifs sur 2.679) et même le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires avec 33,3 pour 100 (637 positifs sur 2.000).

TABLEAU N° 1

Résultats globaux (toutes espèces réunies)

Nombre total des examens pratiqués	Résultats positifs	Résultats
2.000 — 4 *	781 (soit 39 % par rapport au nombre examiné)	1.215 (soit 60,8 % par rapport au nombre examiné)
1.996		

* Quatre prélèvements qui, pour des raisons absolument indépendantes de notre volonté, n'ont pas pu faire l'objet d'un diagnostic certain, ont été écartés de nos statistiques. Ce sont les numéros :

- 320, Bovin reçu le 8-11-1971 de la Meuse,
- 1226, Renard reçu le 11-04-1972 de la Marne,
- 1323, Chevreuil reçu le 27-04-1972 du Haut-Rhin,
- 1747 Ovin reçu le 13-07-1972 de la Meuse.

4.2. Résultats globaux, par espèces animales

Le tableau n° 2 présente la liste des espèces animales que nous avons classées en ordre de fréquence décroissante.

En tête vient le renard, qui fournit à lui seul plus de 58 pour 100 du total des entrées, tandis que les bovins qui arrivent en seconde position ne comptent déjà plus que pour 16 pour 100 du total et les chats pour 8 pour 100 seulement.

On peut légitimement se demander à quoi correspond en réalité cette nette prédominance du renard. Est-ce l'effet ou est-ce la cause de l'insistance avec laquelle on accuse le renard d'être le propagateur de la rage ? On doit en effet se poser honnêtement la question.

TABLEAU N° 2
Résultats globaux par espèces animales

Espèces	Nombre de prélèvements examinés	Résultats positifs	Résultats négatifs	Pourcentage des cas positifs par rapport au nombre de prélèvements examinés
Renards	1.163	554	609	47,6 %
Bovins	321	143	178	44,4 %
Chats	177	18	159	10,2 %
Chiens	93	8	85	8,6 %
Ovins et caprins..	70	24	46	33,7 %
Blaireaux	43	15	28	34,8 %
Fouines	34	6	28	17,6 %
Equidés	22	10	12	45,4 %
Chevreuils	14	2	12	13,3 %
Martres	15	—	15	—
Putois	6	1	5	16,7 %
Porcs	3	—	3	—
Autres animaux sauvages	35	—	35	—
	1 996	781	1.215	

Il est ici hors de propos de nier le rôle réel du renard dans la transmission de la maladie, mais bien simplement d'essayer de comprendre pourquoi il domine si largement dans la liste des espèces que nous recevons.

Par ailleurs lorsqu'on sait, ainsi que le rappelle opportunément le Centre d'Etudes sur la Rage (ANDRAL, 1972) qu'« il n'est sans doute pas exagéré de penser que le nombre des renards réellement enrégés est, selon les départements, de 5 à 10 fois supérieur aux chiffres enregistrés », on s'interroge encore davantage sur la signification à accorder au pourcentage élevé (le plus élevé de toutes les espèces) de renards reconnus rabiques par rapport au nombre de renards reçus (47,6 pour 100), puisque derrière eux les bovins arrivent avec seulement 44,4 pour 100 et les chats ensuite avec 10,2 pour 100, dans les mêmes conditions de calcul.

C'est également le lieu de faire remarquer, sans pouvoir en donner une bonne explication, qu'en ce qui concerne les équidés nous avons 45,4 pour 100 de positifs ; nous signalons que nous n'avons reçu que 22 prélèvements de cette espèce, ce qui ne permet pas de tirer d'enseignements valables.

4.3. Résultats globaux, comparaison entre les différentes techniques du diagnostic

Nous avons vu dans la première partie de ce travail que le diagnostic de rage reposait sur l'emploi de quatre techniques bien distinctes dans leur principe et leurs modalités. Ce sont l'examen en immunofluorescence, l'examen après coloration de Sellers sur calques, l'histopathologie sur coupes et enfin l'inoculation aux souris albinos. Il nous a paru intéressant, à la suite d'ATANASIU, GAMET, GUIL-LON, LEPINE et leurs collaborateurs (1971) qui souhaitaient que fussent publiés des tableaux comparatifs autorisant une étude de valeur des diverses techniques, d'essayer de rendre perceptible de façon formelle quelle est la technique, ou quelles sont les techniques qui permettent d'obtenir les résultats les plus conformes à ce qu'on considère comme étant la réalité. Mais au fait, que peut-on considérer comme étant la réalité ?

Il nous faut revenir en arrière et apprécier les possibilités de chacune des techniques.

4.3.1. Possibilités de l'inoculation

Longtemps, nous l'avons souligné, c'est la méthode biologique par inoculation aux souris albinos qui a été créditée des résultats les plus parfaits. En l'absence d'ailleurs de toute autre méthode véritablement spécifique, il ne pouvait en être autrement ; son ver-

dict, a lui seul parfois, apportait la lumière, seule l'inoculation mettait réellement en évidence ce que l'on cherchait : à savoir le virus rabique. L'inconvénient est qu'en fait, l'inoculation ne permet de découvrir qu'un virus rabique encore vivant et virulent au moment où le prélèvement est transformé en inoculum ; si par contre le virus rabique, qui a pourtant amené la mort de l'animal examiné n'est plus vivant et virulent lorsque le cerveau est exploité au laboratoire, si des substances inhibitrices (voir page 45) ou des anticorps neutralisants l'empêchent de se multiplier et de développer ses effets chez les souris, on aboutit à un résultat négatif. On se rend parfaitement compte à présent qu'il devait en être ainsi autrefois dans un certain nombre de cas.

4.3.2. Possibilités de l'immunofluorescence

Dans le même temps pour ainsi dire où ces notions venaient jeter le doute sur la valeur intrinsèque de la méthode d'inoculation, l'immunofluorescence venait augmenter les possibilités du diagnostic en matière de rage. L'examen en immunofluorescence permet de savoir si le prélèvement suspect contient ou non de l'antigène rabique. Or cet antigène peut correspondre à un virus pleinement vivant et virulent — qui donnera donc une réaction positive sur les souris — ou à un virus inactivé — qui ne donnera aucune réaction in vivo.

4.3.3. Possibilités de la coloration de Sellers

Cette technique simple en théorie et rapide, mais difficile à bien réaliser et à lire, donne des résultats intéressants lorsqu'ils sont positifs ; par contre la négativité ne peut pas être retenue, nous en avons la preuve tous les jours.

4.3.4. Possibilités de l'histopathologie

L'histopathologie suscite les mêmes commentaires que la coloration de Sellers ; elle est peut-être légèrement plus sûre dans le sens de la négativité, que ne l'est le Sellers.

4.3.5. Synthèse de ces éléments

La synthèse de ces éléments de comparaison entre les techniques donne pratiquement la règle suivante :

Il suffit que l'une ou l'autre des quatre techniques donne un résultat positif pour que l'animal d'où provient le cerveau soit considéré comme étant atteint de la rage.

Par voie de conséquence, on considère à juste titre, que le nombre total des résultats positifs obtenus (quel que soit le nombre des techniques ayant prouvé la positivité) est celui qui est le plus conforme à la réalité des choses.

TABLEAU N° 3

Résultats globaux. Comparaison entre les techniques du diagnostic

Total des résultats positifs	Nombre de résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno- fluorescence	l'inoculation aux souris	l'histo- pathologie
781	783	752	634
	soit une « efficacité » de 96 %	soit une « efficacité » de 95,7 %	soit une « efficacité » de 80,7 %

Alors si nous examinons le tableau n° 3 : Résultats globaux, comparaison entre les techniques du diagnostic, nous voyons que :

dans 96 % des cas positifs, l'immunofluorescence a donné une réponse positive,

dans 95,7 % des cas positifs, l'inoculation aux souris a donné une réponse positive,

dans 80,7 % des cas positifs, l'histologie a donné une réponse positive.

La coloration de Sellers n'a pas été mise en comparaison dans ces résultats globaux, parce qu'elle a manqué dans un trop grand nombre de cas (presque les 250 premiers numéros).

Nous appelons le pourcentage que nous avons calculé pour chacune des techniques, pourcentage d' « efficacité » ; il est, bien entendu, rapporté au nombre total des résultats positifs.

L'inconvénient de ce tableau est qu'il envisage globalement les résultats, sans faire de distinction entre ceux qui ont été obtenus par la mise en œuvre d'une seule technique parfois (en ce cas il s'agit forcément de l'inoculation aux souris) et les résultats qui ont été obtenus par deux, trois ou quatre techniques.

4.4. Résultats détaillés : les examens réalisés par moins de quatre techniques

Dans le but d'obtenir une comparaison plus valable, il devient ici nécessaire d'éliminer tout d'abord les résultats qui ont été obtenus sans que les quatre techniques du diagnostic aient pu être mises en œuvre. L'opération consiste à sortir les cartes perforées comportant, dans les emplacements réservés à chacun des résultats, au moins un 0 (= zéro, signifiant : absence de).

Le tableau n° 4 indique le nombre des examens réalisés par moins de quatre techniques.

TABLEAU N° 4

Résultats des examens dans lesquels les quatre techniques n'ont pu être mises en oeuvre

Nombre des examens	Résultats positifs	Résultats négatifs
700	264	436
	soit 37,7 %	

Il convient alors de préciser les raisons pour lesquelles, dans 700 cas, il n'a pas été possible de mettre en oeuvre les quatre techniques. Premièrement dans ces 700 cas entrent les 250 premiers numéros qui n'ont pas tous fait l'objet de la coloration de Sellers ; le reste correspond principalement à des prélèvements arrivés en mauvais état de conservation et pour lesquels il s'est avéré qu'il n'était pas possible de faire les calques destinés à la fluorescence et au Sellers, non plus que la fixation en vue de l'examen histologique. Nous n'avons pas calculé le nombre et le pourcentage de ces divers cas d'impossibilité, mais nous savons, pour l'avoir cherché sur 1.204 prélèvements reçus (inédit, 6 avril 1972) que dans 94,5 pour 100 des cas où toutes les techniques n'avaient pas pu être mises en oeuvre, c'était l'histopathologie qui avait manqué. Cette technique en effet est celle qui exige le meilleur état de conservation des prélèvements, or les encéphales correspondants étaient le siège d'un début de putréfaction.

4.5. Résultats détaillés : les examens réalisés par les quatre techniques

Les 700 cartes correspondant aux examens qui n'avaient pas pu être réalisés par les autres techniques étant retirées, il nous en reste 1.296 pour lesquelles bien entendu les quatre techniques ont pu être mises en oeuvre.

Le tableau n° 5 indique que parmi ces 1.296 cas, on a pu découvrir 517 résultats positifs, soit 39,8 pour 100 par rapport au nombre des examens pratiqués par les quatre techniques ; notons au passage que ce pourcentage de 39,8 pour 100 est peu différent de celui que représentent les 781 cas positifs trouvés sur les 2.000 examens pratiqués, quel que soit le nombre des techniques (tableau n° 1), qui était de 39 pour 100.

TABLEAU N° 5

Résultats détaillés des examens réalisés par les quatre techniques du diagnostic

Nombre total des examens pratiqués par les quatre techniques	Résultats positifs	Résultats négatifs
1.296	517	779
	soit 39,8 %	

Ceci étant, il convient à présent d'étudier en détail ces 517 résultats positifs obtenus à l'aide des quatre techniques, ce qui ne veut aucunement dire, nous le précisons bien, que les techniques aient donné à chaque fois des résultats concordants.

Le tableau n° 6 fournit le nombre des résultats positifs obtenus par chacune des techniques, ainsi que le pourcentage que nous avons appelé pourcentage d'efficacité de chacune d'entre elles par rapport au nombre total des résultats positifs.

TABLEAU N° 6

Comparaison entre les quatre techniques du diagnostic

Total des résultats positifs	Nombre de résultats positifs obtenus par :			
	l'immuno- fluorescence	l'inoculation aux souris	l'histo- pathologie	la coloration de Sellers
	506	500	491	465
517	soit une « efficacité » de 97,8 %	soit une « efficacité » de 96,7 %	soit une « efficacité » de 94,9 %	soit une « efficacité » de 89,9 %

Nombre de résultats positifs obtenus par la concordance des quatre techniques :
445, soit 86 %

Avec des pourcentages d'efficacité différents, nous nous trouvons en présence de la même échelle de valeur qu'avec les résultats globaux (tableau n° 3). C'est ainsi que :

en tête, avec une « efficacité » de 97,8 %, nous trouvons encore l'immunofluorescence ;

en seconde position, avec une « efficacité » de 96,7 %, l'inoculation aux souris ;

en troisième position, avec une « efficacité » de 94,9 %, l'histopathologie ;

en quatrième position, avec une « efficacité » de 89,9 %, la coloration de Sellers.

Il est patent à la lecture de ces données que c'est l'immunofluorescence qui permet de découvrir le plus de cas positifs, suivie de peu par la méthode d'inoculation intracérébrale aux souris. Ce sont ces deux techniques qui sont d'ores et déjà soulignées comme étant les principales, parce que les plus « efficaces ».

Cependant l'analyse, doit être poussée plus avant ; en effet la différence réelle entre les 506 cas de positivité obtenus par l'immunofluorescence et les 500 cas de positivité obtenus par l'inoculation ne se résume pas dans les 6 cas qui arithmétiquement la représentent. Il est clair que les 506 cas ne sont pas les 500 auxquels viennent s'ajouter 6 supplémentaires. Les cas correspondant à chacune des deux catégories ne sont pas identifiables les uns avec les autres. Seuls 445 cas de positivité ont été obtenus par la concordance des quatre techniques, ce qui représente tout de même 86 % des 517 cas.

Pour avancer dans l'interprétation de ces faits importants, nous avons étudié la liste, établie par la tabulatrice alphanumérique, des cas où l'immunofluorescence était négative (11 cas), alors même que le résultat final était positif ; puis nous avons fait de même avec la liste des cas où l'inoculation avait été négative (17 cas), alors même que le résultat final était positif.

Le tableau n° 7 intitulé : Importance des diverses techniques dans la correction des insuffisances relatives de l'immunofluorescence et de l'inoculation, présente les résultats de cette étude.

Ici encore éclate la supériorité de l'immunofluorescence et de l'inoculation. En premier lieu il apparaît que dans les 11 cas où l'immunofluorescence était restée négative, 11 fois l'inoculation était positive. Rappelons que ce calcul ne portant que sur les 517 résultats positifs obtenus avec mise en œuvre des quatre techniques, cela veut bien dire que sans l'inoculation aux souris 11 cas de rage auraient complètement échappé au diagnostic.

En second lieu, sur les 17 cas où l'inoculation était restée négative, 16 fois l'immunofluorescence avait indiqué la positivité ; dont

TABLEAU N° 7

Importance des diverses techniques du diagnostic dans la correction des insuffisances relatives de l'immunofluorescence et de l'inoculation

Sur les 11 cas où l'immuno- fluorescence est restée NEGATIVE	$\left\{ \begin{array}{l} \text{ONZE fois l'inoculation a été positive} \\ 0 \text{ fois l'histopathologie a été positive} \\ 0 \text{ fois la coloration de Sellers a été positive} \end{array} \right.$
Sur les 17 cas où l'inoculation est restée NEGATIVE	$\left\{ \begin{array}{l} \text{SEIZE fois l'immunofluorescence avait été posi-} \\ \text{tive (DONT 2 FOIS A ELLE SEULE)} \\ \text{QUINZE fois l'histopathologie avait été positive} \\ \text{DOUZE fois la coloration de Sellers avait été} \\ \text{positive} \end{array} \right.$

2 fois à elle seule ; on peut par conséquent affirmer que sans l'immunofluorescence 16 fois le diagnostic aurait été retardé et 2 fois le diagnostic n'aurait pas été posé.

Ceci étant, on peut considérer que sur ces 517 résultats positifs, jamais, ni l'examen après coloration de Sellers, ni l'examen histopathologique n'ont pu fournir une positivité que les autres techniques auraient été incapables de déceler à elles seules. Pourtant dans la catégorie des inoculations restées négatives, on remarquera que 15 fois l'histopathologie et 12 fois la coloration de Sellers sont simplement venues corroborer la positivité de l'immunofluorescence.

En résumé les 517 cas reconnus comme positifs avec mise en œuvre des quatre techniques du diagnostic, l'ont été, soit par l'immunofluorescence seule, soit par l'inoculation seule, soit par une concordance de ces deux techniques ; cette concordance s'est produite 490 fois, soit, par rapport aux 517 résultats positifs, dans 94,7 pour cent des cas.

4.6. Résultats détaillés espèce par espèce

Pour finir nous nous sommes demandé si les résultats des examens qui avaient permis la mise en œuvre des quatre techniques du diagnostic, envisagés espèce par espèce, pouvaient présenter de l'intérêt. Cette étude fait l'objet du tableau n° 8.

TABLEAU N° 8
Résultats des examens par espèces réalisés par les quatre techniques
du diagnostic

Nombre de résultats positifs (toutes espèces réunies)	Espèces ou groupes d'espèces	Résultats positifs par espèces ou groupes d'espèces	Résultats obtenus par							
			l'immuno- fluorescence		l'inoculation aux souris		l'histo- pathologie		la coloration de Sellers	
			nombre	%	nombre	%	nombre	%	nombre	%
517	Renards	377	372	98,6	375	99,4	365	96,9	351	93,1
	Bovins	83	81	97,5	76	93,3	76	93,3	69	83,1
	Ovins et caprins	18	17	94,4	16	88,8	17	94,4	15	83,3
	Chats	10	9	90	6	60	9	90	8	80
	Equidés	8	6	75	7	87,5	3	37,5	4	50
	Chiens	6	6	100	6	100	6	100	6	100
	Autres espèces sauvages (blaireaux, chevreuils, mustélidés, etc.)	15	15	100	14	93,2	15	100	12	80
	TOTAUX	517	506		500		491		465	

Malgré un certain bouleversement de la suite des espèces classées dans leur ordre de fréquence de positivité (comparer avec le tableau n° 2 qui est présenté en ordre de fréquence des prélèvements examinés) nous constatons dès l'abord qu'encore une fois le renard vient en tête, suivi par les bovins.

Nous voyons ensuite que les pourcentages d'efficacité de chacune des quatre techniques restent, pour ces deux espèces, très voisins des mêmes pourcentages calculés toutes espèces réunies (voir le tableau n° 6), ce qui est somme toute mathématiquement normal, puisqu'à elles seules ici ces deux espèces réunies comptent pour plus de 88 pour 100 du total.

En ce qui concerne les ovins et caprins, les pourcentages d'efficacité sont tous quatre en dessous du pourcentage du tableau n° 6 calculé toutes espèces réunies. Il en est un peu de même pour le chat, avec toutefois une particularité notable : la chute à 60 pour 100 de l'« efficacité » de l'inoculation (contre 96,1 pour 100 au tableau n° 6). Tout se passe comme si on se trouvait en présence d'un phénomène de production de substances inhibitrices antirabiques correspondant peut-être à une aptitude spécifique du chat, phénomène déjà plus ou moins constaté par LEVADITI (1928).

Les équidés posent peut-être un autre problème spécifique ; nous-même (VILLEMIN, 1972) avons évoqué chez ces animaux l'existence de corpuscules fluorescents spécifiques de toute petite taille qui peuvent même passer pratiquement inaperçus ; c'est bien en somme ce qui se passe dans 25 pour 100 des cas de positivité, puisque l'efficacité de l'immunofluorescence tombe dans cette espèce à 75 pour 100. Parallèlement l'efficacité de l'histologie s'effondre à 37,5 pour 100, tandis que celle de la coloration de Sellers plafonne à 50 pour 100 ; on serait enclin à dire que c'est principalement la méthode biologique d'inoculation intracérébrale aux souris qui est capable de révéler la présence du virus rabique dans l'encéphale des équidés.

Le chien, animal qui a occupé longtemps une place de choix dans la transmission de la rage et qui reste encore, avec le loup de la légende, le vrai vecteur de la rage pour beaucoup, se comporte tout à fait différemment, en ce sens que sur les 8 chiens enrégés que nous avons diagnostiqués, 6 avaient fait l'objet d'examen par les quatre techniques et que celles-ci se trouvaient concordantes dans chaque cas, avec par conséquent une efficacité de 100 pour 100.

Les autres espèces sauvages ont des taux d'efficacité peu éloignés de ceux du tableau n° 6, à l'exception de celui de la coloration de Sellers qui reste médiocre avec 80 pour 100.

4.7. La durée moyenne de l'incubation

Il nous a été facile, grâce à la mécanographie, d'envisager une étude comparative de la durée de l'incubation de la rage chez la souris albinos, selon que le prélèvement provient d'une espèce ou d'une autre. Il était en effet légitime de se demander si l'espèce à partir de laquelle le virus avait été isolé n'avait pas un rôle à jouer dans la durée de l'incubation chez la souris utilisée pour le diagnostic. Cela revenait en somme à se poser la question de l'existence d'un certain degré d'adaptation virale à une espèce animal donnée ; nous pensions ici principalement au cas de l'espèce vulpine ; en effet la transmission qui s'opère électivement entre sujets de cette espèce pouvait avoir provoqué ce qu'on nomme « adaptation à une espèce animale par passages en série », auquel cas la virulence de la souche augmente pour l'espèce considérée, mais diminue pour les autres espèces ; cette diminution se traduisant, entre autres, par un allongement du temps de l'incubation.

Nous avons noté la durée de l'incubation de la façon suivante.

Nous nous sommes toujours basé sur la date du premier cas de mortalité sur les souris inoculées et nous avons pris comme durée, le numéro du jour tel qu'il figure sur les feuilles d'observation. Par

TABLEAU N° 9

Durées moyennes de l'incubation sur souris albinos

Prélèvements provenant de :	Nombre de cas étudiés	Durée moyenne de l'incubation
Renards	399	12,10 jours
	545	12,25 jours
Bovins	99	13,13 jours
	128	13 jours
Ovins et caprins	22	13,41 jours
Chats	12	13,92 jours

exemple, pour une première mortalité survenant le 12^e jour, nous avons enregistré une durée d'incubation de 12 jours. Il est au surplus plus facile, et surtout moins subjectif, de se baser ainsi sur l'apparition du premier cadavre plutôt que sur la première morbidité.

4.7.1. Prélèvements isolés sur l'espèce vulpine

Nous avons à notre disposition 545 mesures de l'incubation. La durée moyenne de l'incubation est de 12,25 jours

4.7.2. Prélèvements isolés sur l'espèce bovine

Nous disposons de 128 mesures de l'incubation. La durée moyenne de celle-ci est de 13 jours.

4.7.3. Prélèvements isolés sur l'espèce ovine et l'espèce caprine

Sur 22 mesures nous avons une moyenne de 13,41 jours.

4.7.4. Prélèvements isolés sur l'espèce féline

Sur 12 mesures nous obtenons une moyenne de 13,92 jours.

Ces chiffres sont à rapprocher de deux que nous avons calculés précédemment sur les 1.000 premiers cas étudiés dans notre laboratoire (inédit, 6 avril 1972). Prenant en considération 399 durées d'incubation de souches virales isolées à partir du renard et 99 isolées à partir des bovins, nous obtenions respectivement les durées moyennes ci-après : 12,10 jours et 13,13 jours.

Tous ces chiffres figurent dans le tableau n° 9.

Alors qu'à première vue les souches rabiques provenant du renard semblent avoir une durée d'incubation plus courte chez la souris que celles provenant des autres espèces, force est d'admettre que du point de vue statistique, les différences n'ont aucune valeur significative.

Néanmoins l'indication donnée par les chiffres obtenus ne permet que difficilement de croire à une adaptation du virus à l'espèce vulpine ; si tel était le cas nous aurions plutôt une tendance à l'allongement de la durée de l'incubation sur la souris, puisque celle-ci appartient à une espèce différente de celle à laquelle le virus serait adapté.

Faut-il en conclure pour autant que l'espèce d'origine n'a aucune influence sur cette durée d'incubation ? Nous ne le croyons pas. Dans les conditions de routine où nous étions placé, il n'a peut-être pas été possible de mettre en évidence une modification qui pourtant pourrait être bien réelle. En effet le comptage en unité-jour, par rapport à un temps total moyen qui est de 12 à 13 jours, nous fait employer une unité qui est de valeur trop élevée par rapport à ce que nous souhaitons mesurer.

Quand on se souvient au surplus que la période sensible, autrement dit celle pendant laquelle les souris sont susceptibles de montrer les signes de la rage, ne dure généralement que peu de jours (du jour 7 au jour 15 en règle très générale), on se rend encore mieux compte de ce que notre unité de mesure est égale au 1/8 de

la grandeur à mesurer. Il en résulte fatalement que des variations de la durée de l'incubation qui seraient inférieures à 24 heures ne peuvent être traduites. En fait on peut penser que les variations auxquelles on peut s'attendre sont de l'ordre de quelques heures seulement.

Une étude de ce genre devrait être reprise si l'on voulait aboutir à une conclusion valable, en prenant pour unité de compte non plus le jour, mais l'heure. On imagine alors quelles complications cette observation horaire entraînerait.

4.8. Délai d'envoi de la réponse aux 2.000 premières demandes de diagnostic

Nous avons calculé les délais qui s'étaient écoulés entre la réception d'un prélèvement et l'envoi d'une réponse définitive pour nos 2.000 premiers résultats.

Le tableau n° 10 envisage tout d'abord les cas positifs et en second lieu les cas négatifs.

TABLEAU N° 10

Délais d'envoi de la réponse définitive pour les 2.000 premiers résultats

Résultats	Délai et technique employée	Nombre	Pourcentage par rapport aux 2.000 résultats
Positifs (785)	En quelques heures grâce l'immunofluorescence	753	37,6 %
	En 72 heures grâce à l'histopathologie	8	0,4 %
	En 13 jours en moyenne * grâce à l'incubation	24	1,2 %
Négatifs (1.215)	En 28 jours, fin de la période d'observation des souris	1.215	60,8 %

* Voir le tableau n° 9 : Durées moyennes de l'incubation sur souris albinos.

En ce qui regarde les cas négatifs, nous envoyons une première réponse provisoire dès que nous sommes en possession du résultat de l'histopathologie ; ce bulletin tient compte uniquement de l'examen

en immunofluorescence, de la coloration de Sellers et de l'histopathologie. La réponse définitive ne peut partir qu'une fois écoulée la période d'observation de 28 jours.

Les cas positifs se divisent en trois catégories. D'abord ceux qui se sont révélés dès l'examen en immunofluorescence ou la lecture de la coloration de Sellers, c'est-à-dire dans les quelques heures qui font suite à la réception du courrier. Par retour du courrier la réponse peut être adressée au demandeur.

Ensuite, c'est après 72 heures depuis l'entrée du prélèvement que nous pouvons lire les lames d'histopathologie.

Enfin 13 jours en moyenne après réception de l'animal suspect nous disposons du résultat de l'observation des souris inoculées.

Les pourcentages figurant dans la dernière colonne du tableau n° 10 sont calculés par rapport aux 2.000 demandes de diagnostic ; ainsi donc, 37 fois sur 100 nous sommes en mesure de donner une réponse positive par courrier tournant. Par rapport au total des cas positifs, c'est dans 96 pour 100 des cas que la réponse part dans les heures qui suivent.

5. COMPARAISONS AVEC LES RESULTATS OBTENUS DANS D'AUTRES CENTRES DE DIAGNOSTIC DE LA RAGE

Une fois en possession de nos propres résultats, il a été tentant de les comparer avec ceux qui ont été publiés par d'autres centres de diagnostic spécialisés.

Nous les envisagerons ici dans l'ordre chronologique de leur publication.

Il est à noter qu'aucun des auteurs ne prend en considération la coloration de Sellers dans ses statistiques.

GREGOIRE (1969) travaillant à l'Institut Pasteur du Brabant (Belgique) publie les résultats de 1.520 examens ayant donné lieu à 628 cas de positivité, puis de 967 autres examens ayant fourni 330 positifs. Le tableau ci-après en résume les conclusions comparatives entre les techniques d'immunofluorescence, d'histopathologie et d'inoculation.

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno- fluorescence	l'histo- pathologie	l'inocula- tion
628	99,2 %	—	98,3 %
330	—	73,6 %	99,4 %

Des chiffres très intéressants ont été recueillis et publiés par WACHENDORFER (1970) qui groupe judicieusement les résultats publiés par 14 groupes de travail de divers pays du monde entier (Allemagne, Canada, Inde, Israël, Mexique, U.R.S.S., U.S.A.). Le tableau suivant, tiré de celui qu'a fait connaître WACHENDORFER, procède à la comparaison qui nous occupe pour 1.996 cas positifs sur un total de 12.862 examens pratiqués.

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno-fluorescence	l'histo-pathologie	l'inoculation
1.996	98,6 %	80,1 %	98,1 %

Le service de la rage du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires à Alfort a indiqué (LUCAS et collaborateurs, 1971) pour un total de 637 cas positifs, toutes espèces réunies, les pourcentages de résultats positifs obtenus par les trois techniques. Nous présentons ci-après un tableau réalisé d'après les chiffres publiés.

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno-fluorescence	l'histo-pathologie	l'inoculation
637	87,8 %	65,7 %	93,3 %

Les chercheurs de l'Institut Pasteur de Paris ont pour leur part fait connaître (LEVADITI et collaborateurs, 1972) une étude comparative portant sur 178 cas positifs décelés au cours de 2.104 examens. Nous l'adaptions dans sa présentation pour autoriser une comparaison.

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno-fluorescence	l'histo-pathologie	l'inoculation
178	90,4 %	87,6 %	99,1 %

Au moment de mettre sous presse, nous avons connaissance de la publication de GAMET, GUILLON, LEVADITI et VALLEE (1972) qui étudient 2.679 prélèvements reçus à l'Institut Pasteur de 1968 à 1971. Ces auteurs ont recueillis 237 cas positifs par les trois méthodes principales du diagnostic. Analysés sous forme du même tableau, nous avons :

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno-fluorescence	l'histo-pathologie	l'inoculation
237	89 %	87,7 %	99,1 %

Nos propres chiffres, toujours de la même manière (voir le tableau n° 3) sont rappelés ici.

Total des résultats positifs	Résultats positifs obtenus par :		
	l'immuno-fluorescence	l'histo-pathologie	l'inoculation
517	97,8 %	94,9 %	96,7 %

Ce qui ressort, en première analyse, c'est que partout, sauf à notre laboratoire, c'est l'inoculation qui recueille le meilleur pourcentage d'efficacité par rapport aux autres techniques ; par contre, chez nous l'efficacité maximale par rapport aux autres techniques est attribuée à l'immunofluorescence. Il en est d'ailleurs ainsi chez GREGOIRE. Cette circonstance peut être expliquée par le fait que son laboratoire, tout comme le nôtre, se trouve au contact des régions où sévit la rage et qu'il est, dans de telles conditions, possible de recevoir des cadavres et des cerveaux en bon état ; en meilleur état en tous les cas que les laboratoires parisiens plus éloignés que sont l'Institut Pasteur de Paris ou le Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort, chez lesquels l'efficacité de l'immunofluorescence est inférieure à celle de l'inoculation. On sait d'ailleurs qu'ATANASIU, GAMET, GUILLON, LÉPINE et leurs collaborateurs (1971) avaient déjà insisté sur la nécessité d'une bonne conservation du matériel suspect à examiner pour que l'immunofluorescence donne un résultat fiable.

Quant aux chiffres de WACHENDORFER, il nous paraît difficile de les commenter utilement, car il est vraisemblable que les données de base de chacun des laboratoires d'origine sont quelque peu différentes les unes des autres.

6. CONCLUSIONS

6.1. Nous avons montré l'intérêt, et même la nécessité, du diagnostic expérimental de la rage ; non seulement pour confirmer un diagnostic clinique toujours difficile à établir avec une certitude absolue, mais aussi pour permettre de dresser et de tenir à jour, grâce aux analyses faites sur les animaux sauvages, une carte épidémiologique la plus fidèle possible, dans l'espace et dans le temps, du front de la rage. En possession d'un tel document, les vétérinaires peuvent conseiller plus utilement leurs clients sur l'opportunité de la vaccination antirabique de leurs animaux, qu'ils soient animaux de rapport ou animaux de compagnie. Bien mieux, les médecins responsables des Centres de traitement antirabique y puisent de précieux renseignements qui sont de nature, nous l'avons vu, à les aider dans la délicate décision qu'ils ont parfois à prendre et qui peut se résumer ainsi : dois-je traiter ou dois-je m'abstenir de traiter la personne qui me consulte ?

6.2. Nous avons exposé les quatre techniques qui, selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé, doivent concourir au diagnostic de la rage. Nous avons dit ce que notre expérience de plus de 2.400 diagnostics nous avait amené à apporter comme modifications de détail.

6.3. Nous nous sommes efforcé d'amener un peu de clarté dans la controverse sur la nature des corps de Negri par rapport aux corpuscules fluorescents spécifiques mis en évidence par la réaction immunologique spécifique. Nous avons dit qu'à notre avis, les uns n'étaient pas assimilables aux autres, du moins sans grandes nuances.

6.4. Nous avons fait connaître, grâce à 10 tableaux, et nous avons commenté les résultats que nous avons obtenus au Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy sur les 2.000 premières analyses pratiquées.

Nous pensons que, dans les conditions où nous étions placés, la supériorité de l'immunofluorescence et de l'inoculation aux souris, en matière d' « efficacité », est amplement démontrée.

Nous avons vu qu'en effet, sur les 1.996 analyses recensées, 517 diagnostics positifs avec mise en œuvre des quatre techniques ont été posés, soit par l'immunofluorescence seule, soit par l'inoculation seule, soit par la concordance des deux techniques (ce qui s'est produit 490 fois).

En conséquence nous proposons que soit admise, dans le diagnostic épizootologique de la rage (c'est-à-dire le diagnostic qui n'aura pas comme conséquence ultime le traitement ou l'abstention de traitement d'une personne considérée comme contaminée) la simplification suivante :

Au cas où le diagnostic serait positif de façon non douteuse grâce à l'examen en immunofluorescence, on se contenterait de l'inoculation aux souris, en se dispensant de la coloration de Sellers et surtout de l'histopathologie qui est une méthode relativement longue et coûteuse. L'histopathologie ne serait mise en œuvre que dans le cas d'une immunofluorescence douteuse.

7. BIBLIOGRAPHIE

- ANDRAL (L.). — La rage en France. Journée d'Etudes de la Société Vétérinaire Pratique, Pont-à-Mousson, 22 octobre 1972. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique*, 1972, 8, 463-472.
- ANDRAL (L.), SERIE (Ch.). — Etudes expérimentales sur la rage en Ethiopie. *Annales Institut Pasteur*, 1957, 93, 475-488.
- ATANASIU (P.). — Connaissances et techniques actuelles sur la rage. *Pathologie-Biologie*, 1967, 15, 1103-1118.
- ATANASIU (P.). — Le diagnostic de la rage par immunofluorescence, in Cours sur les techniques de l'immunofluorescence. Office International des épizooties et Institut Pasteur de Paris, du 6 au 11 juillet 1970.
- ATANASIU (P.). — La rage expérimentale et le virion rabique. *Bulletin Institut Pasteur*, 1970, 68, 2047-2068.
- ATANASIU (P.), DRAGONAS (P.), TSIANG (H.), HARBI (A.). — Immuno-péroxydase. Nouvelle technique spécifique de mise en évidence de l'antigène rabique intra et extra-cellulaire en microscopie optique. *Annales Institut Pasteur*, 1971, 121, 247-250.
- ATANASIU (P.), GAMET (A.), GUILLON (J.C.). — Limites du diagnostic de la rage au laboratoire. *Recueil Médecine Vétérinaire*, 1968, CXLIV, 1083-1088.
- ATANASIU (P.), GAMET (A.), GUILLON (J.C.), LEPINE (P.), LEVADITI (J.C.), TSIANG (H.), VALLEE (A.). — Possibilités et limites de l'immunofluorescence dans le diagnostic de la rage au laboratoire. *Pathologie-Biologie*, 1971, 19, 207-212.
- ATANASIU (P.), GAMET (A.), GUILLON (J.C.), LEVADITI (J.C.). — La place actuelle du laboratoire dans le diagnostic de la rage. *La Presse Médicale*, 1970, 78, 2237-2240.
- ATANASIU (P.), GUILLON (J.C.), VALLEE (A.). — Contribution à l'étude de la rage expérimentale du renard. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1970, 119, 260-269.
- BARBESIER (J.), RAMPON (R.). — Remarques sur le diagnostic de la rage au laboratoire. *Archives Institut Pasteur d'Algérie*, 1962, XL, 186-195.
- CAQUEL (J.F.). — Les accidents neurologiques de la vaccination antirabique. A propos de 5 cas. Thèse de doctorat en médecine, Nancy, 1971.
- CHALMERS (A.W.), SCOTT (G.R.). — Ecology of Rabies. *Tropical Animal Health and Production*, 1969, 1, 33-55.
- DARTEVELLE (D.). — Contribution à l'étude épidémiologique, diagnostique et prophylactique de la rage dans l'Est de la France. Thèse de doctorat en médecine, Strasbourg, 1970.
- DEAN (D.J.). — Epreuve des anticorps fluorescents, p. 61 à 71, in La Rage. Monographie n° 23 de l'O.M.S., Genève, 1967.
- DUPOUEY (P.). — La pratique de l'immunofluorescence, in Cours sur les techniques de l'immunofluorescence. O.I.E. et Institut Pasteur de Paris, du 6 au 11 juillet 1970. X
- EIKMEIER (H.). — Tollwutdiagnose am Lebenden Tier, p. 40 à 43, in Aktuelle Probleme der Tollwut. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, 1970.
- FAURE (M.). — 1. - Les bases de l'immunofluorescence. 2. - La préparation des sérums fluorescents, in Cours sur les techniques de l'immunofluorescence. O.I.E. et Institut Pasteur de Paris, du 6 au 11 juillet 1970.
- FISCHER (R.). — Contribution à l'étude de la rage en Alsace : épidémiologie depuis 1970, efficacité de la vaccination. Thèse de doctorat en médecine, Strasbourg, 1972.
- GAMET (A.). — Traitement et prévention médicale de la rage chez l'homme. *Economie et Médecine Animales*, 1971, 12, 325-340.
- GAMET (A.), GUILLON (J.-C.), LEVADITI (J.-C.), VALLÉE (A.). — Evolution de la rage en France de 1968 à 1971 : incidence chez les animaux ayant pu contaminer l'homme *Bulletin Académie Vétérinaire*, 1972, XLV, 337-341.

- GOLDWASSER (R.A.), KISSLING (R.E.). — Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biology*, 1958, 98, 219-223.
- GORET (P.). — A propos de la symptomatologie de la rage bovine au cours de l'actuelle enzootie française. *Bulletin Académie Vétérinaire de France*, 1969, 13, 163-168.
- GREGOIRE (M.). — La réapparition de la rage en Belgique. *Bulletin Académie Royale de Médecine*, 1969, 9, 229-262.
- GUILLON (J.C.). — Communication personnelle, 1972.
- GUILLON (J.C.), GAMET (A.), ATANASIU (P.), VALLEE (A.), VIRAT (B.). — La rage dans l'Est de la France. Enseignements tirés par le laboratoire. *Bulletin Académie Vétérinaire de France*, 1970, 14, 29-32.
- HARNETIAUX (I.). — La rage des ruminants. Observations cliniques recueillies dans une clientèle. Journée d'Etudes de la Société Vétérinaire Pratique, Pont-à-Mousson, 22 octobre 1972. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique*, 1972, 8, 473-476.
- JOUBERT (L.), LOMBARD (M.). — Pratique du diagnostic actuel de la rage. *Revue Médecine Vétérinaire*, 1968, 119, 1041-1056.
- KAPLAN (M.M.). — Rôle du laboratoire dans le diagnostic et la prévention de la rage, p. 11 à 17, in *La Rage. Techniques de laboratoire*, Monographie n° 23 de l'O.M.S., Genève, 1967.
- LARGHI (O.P.), JIMENEZ (Ch.). — Metodo para acelerar la tecnica de immuno-fluorescencia para el diagnostico de la rabia. *Boletin de la Cf. San. Panamer*, 1971, juillet, 36-40.
- LAURENT (J.). — Le point épidémiologique actuel de la rage vulpine en France. Dédutions prophylactiques. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 1972.
- LENNETTE (E.H.), EMMONS (R.W.). — The laboratory diagnosis of Rabies : Review and prospective, p. 77 à 89, in *Rabies, Working Conference on Rabies*, Tokyo, 1970, *University Park Press*, 1971.
- LEPINE (P.). — Diagnostic histopathologique de la rage, p. 43 à 60, in *La Rage, Techniques de laboratoire*. Monographie n° 23 de l'O.M.S., Genève, 1967.
- LEPINE (P.), ATANASIU (P.), GAMET (A.). — La vaccination antirabique avant contamination. *Journal de Thérapeutique*, 1971, 11, 4 p.
- LEPINE (P.), CROISSANT (O.). — Microscopie des corps de Negri dans la rage des rues. Méthode de repérage et d'examen des coupes histologiques en microscopie électronique. *Annales Institut Pasteur*, 1951, 81, 1 à 8, avec 2 planches hors texte.
- LEPINE (P.), GAMET (A.). — La rage, 1 volume, 140 pages. *L'Expansion Scientifique*, Paris, 1969.
- LEVADITI (J.C.) et ses Collaborateurs. — Comparative results obtained by three diagnosis methods in wild and domestic animals in Pasteur Institute of Paris. En cours de publication (communiqué par les auteurs).
- LUCAS (A.), CARNERO (R.), PICARD (M.), COSTES (C.). — L'épizootie rabique française du nord-est après un an d'évolution. *Revue Médecine Vétérinaire*, 1969, 120, 427-431.
- LUCAS (A.), CARNERO (R.), PICARD (M.), COSTES (C.). — Distribution géographique et évolution épizootologique des 250 premiers cas de rage en France. *Revue Médecine Vétérinaire*, 1970, 33, 95-106.
- LUCAS (A.), CARNERO (R.), PICARD (M.), COSTES (C.), LAHELLEC (M.). — Le diagnostic expérimental de la rage. *Economie et Médecine Animales*, 1971, 12, 297-324.
- MANIGAULT (P.). — Les principes de la fluorescence. L'appareillage d'observation microscopique, in *Cours sur les techniques d'immunofluorescence*. O.I.E. et Institut Pasteur de Paris, du 6 au 11 juillet 1970.
- MCQUEEN (J.L.), LEWIS (A.I.), SCHNEIDER (N.J.). — Rabies diagnosis by fluorescent antibody. *Amer. Journal of Public Health*, 1960, 50, 1743-1752.

- MEDAWAR (P.B.). — Immunity to homologous grafted skin : III. - The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Brit. J. Exper. Path.*, 1948, 29, 58.
- MEYER (M.), HEIDELBERGER (M.). — Velocity of combinaison of antibody with specific polysaccharides of pneumococcus. *J. Biol. Chem.*, 1942, 143, 570-574.
- MIYAMOTO (K.), MATSUMOTO (S.). — The nature of the Negri body. *J. Cell. Biol.*, 1965, no 3, 677.
- NAGANO (Y.), DAVENPORT (F.M.). — Rabies. Proceeding of Working Conference on Rabies, Tokyo, 1970, 1 volume, 406 pages, *University Park Press*, 1971.
- ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. — La Rage, Techniques de laboratoire, Monographie no 23, 184 pages, 2^e édition, Genève, 1967.
- PITZSCHKE (H.). — Epizootiology of Rabies in Europe. Symposium international sur la rage, Talloires, 1965; *Symp. Ser. immunobiol. Standard*, 1, 231-236.
- RAPPORT ANNUEL SUR LE FONCTIONNEMENT DU CENTRE D'ETUDES SUR LA RAGE DE NANCY. Année 1972.
- ROHMER (F.), LAVILLAUREIX (J.), ZENGLEIN (J.P.), JESEL (M.), DARTEVELLE (D.), DUREUX (J.B.), WEBER (M.), KIFFER (B.), CANTON (Ph.), ARBOGAST (J.). — Les complications neurologiques au cours des vaccinations antirabiques préventives ou thérapeutiques. A propos de 11 cas. *Revue Neurol. Paris*, 1971, 124, 33-53.
- ROSE (N.J.), SCHNURRENBERGER (P.R.), MARTIN (R.J.). — Rabies prophylaxis, The physician's dilemma. *Arch. Environ. Health*, 1971, 23, 57-60.
- SCHOOP (G.), WACHENDORFER (G.), LINZENMEIER (G.), KUWERT (E.). — Aktuelle Probleme der Tollwut. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Frankfurt, 17 et 18 avril 1969, 1 volume, 128 pages, *Gustave Fischer Verlag*, Stuttgart, 1970.
- SCHNEIDER (L.G.). — Anwendungsbereiche der Immunofluoreszenz bei Tollwut, pp. 24 à 29, in Aktuelle Probleme der Tollwut, Symposium der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Frankfurt, 17 et 18 avril 1969, *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, 1970.
- SELLERS (T.F.), FELLOW (F.H.). — A new method for staining Negri bodies of rabies. *Amer. J. Public Health*, 1927, 17, 1080.
- SERIE (Ch.), ANDRAL (L.). — Etudes expérimentales sur la rage en Ethiopie. *Annales Institut Pasteur*, 1960, 98, 688-693.
- SHIMADA (K.). — The last rabies outbreak in Japan, p. 11 à 35, in Rabies, Working Conference on Rabies, Tokyo, 1970, *University Park Press*, 1971.
- SIKES (R.K.). — Pathogenesis of rabies in wildlife. I. - Comparative effect of varying doses of rabies virus inoculated into foxes and skunks. *Am. J. of Vet. Research*, 1962, 23, 1041-1047.
- STRADY (A.). — La rage. - Etude épidémiologique et prophylactique, à propos de l'épizootie française. Thèse de doctorat en médecine, Reims, 1972.
- THIERY (G.). — Importance du mode de conservation des prélèvements destinés à l'établissement du diagnostic de rage. *Bull. Epiz. Dis. Afric.*, 1957, 5, 373-375.
- THIERY (G.). — Particularités de la rage dans l'Ouest africain. *Bull. Epiz. Dis. Afric.*, 1957, 7, 265-286.
- TIERKEL (E.S.). — Recherches extemporanées des corps de Negri et préparation des spécimens pour les essais biologiques, pp. 27-42, in La Rage, techniques de laboratoire, Monographie no 23 de l'O.M.S., Genève, 1967.
- TOMA (B.), ANDRAL (J.). — La rage vulpine en France. *Cahiers Médecine Vétérinaire*, 1970, 39, 99-155.
- VILLEMEN (M.). — A propos de la rage en Moselle. La destruction du renard est-elle nécessaire ? *Bulletin Académie Lorraine des Sciences*, 1969, 8, 13-20.
- VILLEMEN (M.). — Rabies in European Wildlife. Second International Conference on Wildlife Disease, du 18 au 22 juillet 1971 à l'Université du Sussex (Grande-Bretagne), pour paraître, in *J. of Wildlife Diseases*, P.O. Box 886, Ames, Iowa, U.S.A.

- VILLEMIN (M.). — A propos de la rage chez le cheval. Journée d'études de la Société Vétérinaire Pratique, Pont-à-Mousson, 22 octobre 1972. *Bulletin de la Soc. Vétérinaire Pratique de France*, 1972, 8, 477-479.
- VILLEMIN (M.). — Conservation du virus rabique chez la caille domestique (*Coturnix japonica*) après inoculation intracérébrale. *Bulletin Académie Vétérinaire*, 1972, XLV, 237-238.
- WACHENDORFER (G.). — Tollwutdiagnostik beim Tier mit Hilfe der Immunofluoreszenz — Konsequenzen für die Wutschutzbehandlung des Menschen. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 1967, 7, 451.
- WACHENDORFER (G.). — Die Immunofluoreszenz in der Routinediagnostik, pages 30 à 35, in *Aktuelle Probleme der Tollwut*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1970.
- WILSNACK (R.E.), PARKER (R.I.). — Pathogenesis of skunk rabies virus; Rabies inhibiting substance as related to rabies diagnosis. *Amer. J. of Vet. Research*, 1966, 27, 39-43.
- WIKTOR (T.J.). — Kinetics of rabies virus growth in tissue culture. *Proc. Nat. Rabies Symposium*, 1966, 9.
- WIKTOR (T.J.). — Dynamics of rabies virus infection in tissue culture. Symposium on Rabies, Talloires; *Symp. Ser. Immunobiol. Standard*, 1966, 1, 65.
- WIKTOR (T.J.). — Nature and properties of rabies virus, p. 37 à 51, in *Rabies Working Conference on Rabies*, Tokyo, 1970, *University Park Press*, 1971.
- WIKTOR (T.J.), FERNANDEZ (M.W.), KOPROWSKI (H.). — Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain W I 38. *J. Immunol.*, 1964, 93, 353.
-

TABLE DES MATIÈRES

O.1. Avant-propos	3
O.2. Plan du travail	5
1. Généralités	6
1.1. La rage dans le monde	6
1.1.1. La rage des Chiroptères	6
1.1.2. La rage des Mustelidés	6
1.1.3. La rage du skunks	6
1.1.4. La rage du chien et du chat des villes	6
1.1.5. La rage du loup	6
1.1.6. La rage du coyote	6
1.1.7. La rage du raton-laveur	6
1.1.8. La rage du lynx	6
1.1.9. La rage de l'opossum	6
1.1.10. La rage des Viverridés	6
1.1.11. La rage des Canidés sauvages, dont le chacal	8
1.1.12. La rage des rongeurs	8
1.1.13. La rage du renard	8
1.2. La rage en France	9
1.2.1. Organisation administrative et technique de la lutte contre la rage	15
1.2.2. Prophylaxie mise en œuvre	15
1.2.2.1. Lutte contre le vecteur sauvage	15
1.2.2.2. Prophylaxie sur les animaux domestiques	16
1.3. Nécessité et importance du diagnostic au laboratoire	16
2. Les conditions de travail au Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy ..	19
2.1. Le personnel	19
2.1.1. La protection du personnel	20
2.2. Le bâtiment	21
3. Les techniques du diagnostic	22
3.1. Généralités	22
3.1.1. Méthodes de diagnostic à résultat rapide	22
3.1.2. Méthode de diagnostic à résultat moins rapide	22
3.1.3. Méthode de diagnostic à résultat différé	22
3.2. Techniques préparatoires communes aux quatre examens	23
3.2.1. Réception et exploitation des prélèvements	23
3.2.2. Prélèvement et étude de la seule corne d'Ammon	25
3.3. L'immunofluorescence	26
3.3.1. Généralités	26
3.3.2. Le matériel nécessaire	26
3.3.2.1. Les lames histologiques	26
3.3.2.2. Le conjugué antirabique	26
3.3.2.3. Les microscopes	27
3.3.2.4. Le local d'examen	28
3.3.3. Réalisation	28
3.3.4. Lecture	29
3.3.5. La conservation des lames d'immunofluorescence	32
3.3.6. Variantes dans le traitement des lames d'immunofluorescence	32

3.4. La coloration de Sellers	33
3.4.1. Le matériel nécessaire	34
3.4.2. Réalisation	35
3.4.3. Lecture	36
3.5. L'histopathologie	37
3.5.1. Le matériel nécessaire	37
3.5.1.1. La préparation du colorant	37
3.5.2. Réalisation	38
3.5.3. Lecture	38
3.5.4. Nature des corps de Negri dans la rage des rues	40
3.6. L'inoculation aux souris	44
3.6.1. L'animagerie et les animaux	45
3.6.2. Réalisation	47
3.6.2.1. La préparation de l'inoculum	47
3.6.2.2. L'inoculation intracérébrale	49
3.6.2.3. Le nombre des souris inoculées	51
3.6.2.4. La durée de l'incubation	52
3.6.2.5. Essais de réduction de la durée d'incubation	52
4. Résultats obtenus au Centre d'Etudes sur la Rage de Nancy	53
4.1. Résultats globaux, toutes espèces réunies	54
4.2. Résultats globaux par espèces animales	55
4.3. Résultats globaux : comparaison entre les différentes techniques du diagnostic	56
4.3.1. Possibilités de l'inoculation	56
4.3.2. Possibilités de l'immunofluorescence	57
4.3.3. Possibilités de la coloration de Sellers	57
4.3.4. Possibilités de l'histopathologie	57
4.3.5. Synthèse de ces éléments	57
4.4. Résultats détaillés : les examens réalisés par moins de quatre techniques	58
4.5. Résultats détaillés : Les examens réalisés par les quatre tech- niques	59
4.6. Résultats détaillés par espèces animales	62
4.7. Durée moyenne de l'incubation chez les souris inoculées	65
4.7.1. Prélèvements isolés sur l'espèce vulpine	66
4.7.2. Prélèvements isolés sur l'espèce bovine	66
4.7.3. Prélèvements isolés sur les espèces ovine et caprine	66
4.8. Délai d'envoi de la réponse aux 2 000 premières demandes de diag- nostic	67
5. Comparaisons avec les résultats obtenus dans d'autres centres de diag- nostic de la rage	68
6. Conclusions	71
7. Bibliographie	73

Vu, approuvé et permis d'imprimer.

NANCY, le 26 décembre 1972

Le Président du Conseil de l'Université
de NANCY I :

J.-R. HELLUY

